



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Biologie cellulaire

Présentée et soutenue par :

Yoann FEDOR

le : lundi 19 novembre 2012

Titre :

Nouveau biomarqueur en temps réel de cassures double-brin de l'ADN et
génétoxicité de la Cytolethal Distending Toxin.

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

UMR1331 TOXALIM INRA/INP - Equipe Génotoxicité & Signalisation

Directeur(s) de Thèse :

Gladys MIREY, Bernard SALLES

Rapporteurs :

Sylvie CHEVILLARD

Filippo ROSSELLI

Membre(s) du jury :

Sylvie CHEVILLARD, directrice de recherche, CEA, Fontenay-aux-Roses.

Gladys MIREY, maître de conférences, INRA-Toxalim, Toulouse.

Filippo ROSSELLI, directeur de Recherche 2, CNRS, Villejuif.

Bernard SALLES, professeur des universités, INRA-Toxalim, Toulouse.

Remerciements

Cette thèse ne serait pas la même sans la contribution scientifique et le soutien de plusieurs personnes que je souhaite remercier ici.

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr **Sylvie CHEVILLARD** et le Dr **Filippo ROSSELLI** de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Merci à **Gladys MIREY**, ma co-directrice de thèse, sa confiance dans mes capacités m'a permis de développer mon autonomie et ma propre confiance en moi. Je te remercie pour ton soutien indéfectible quelles que soient les difficultés. Ton énergie, ta bonne humeur (sonore) et tes conseils m'ont toujours permis d'aller de l'avant.

Je tiens à remercier le Pr. **Bernard SALLES**, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir fait partager son expérience et son recul scientifique.

Julien VIGNARD, merci pour l'intérêt que tu as porté à mes projets. Ton expérience et ton raisonnement scientifique pointu ont été une bouffée d'oxygène. Merci pour les discussions scientifiques riches, toujours dans la bonne humeur, et pour les « manip de la mort ». Moi aussi, j'espère qu'un jour Steven Seagal sera reconnu à sa juste valeur.

Je remercie **Elisa BOUTET**, pour sa disponibilité et sa joie de vivre. Merci de m'avoir initié au monde des comètes et de m'avoir transmis la rigueur et la précision indispensables à cette technique. Promis, à l'avenir je ne relierai mes documents que par thermo-collage.

Merci beaucoup à **Marie-Laure TRAVERS**, pour avoir initié et « défriché » le projet CDT. Ta rigueur et ton sens du travail bien fait ont toujours été un exemple pour moi.

Merci à **Saleha HASHIM**, pour son travail qui est à la base de chaque expérience du laboratoire et qui nous permet d'avancer plus vite. Je te remercie pour ta gentillesse quotidienne.

Je tiens à remercier **Dennis JULLIEN**, pour nous avoir fait partager ses compétences en microscopie et en biologie moléculaire. Sa sympathie et sa persévérance ont été de réels bonus pour le projet nanobodies.

Aurélien OLICHON, merci d'avoir eu la patience d'initier des néophytes au monde fabuleux des nanobodies. Grâce à ta pédagogie et ton engouement, les nanobodies sont devenus une réelle passion pour moi.

Merci à **Elisabeth BEZINE**, pour sa sérénité et sa ténacité. Je te souhaite de réussir et de t'épanouir dans ton doctorat, le projet CDT est maintenant entre tes mains.

Je remercie **Oriane, Jessica, Emma**, les « drôles de dames » de l'IPBS. Vous avez toujours été là pour me soutenir dans les difficultés. Les obstacles scientifiques ne sont pas les seuls écueils d'une thèse, et il est bon de pouvoir compter sur des alliés pour les surmonter.

Merci beaucoup à **ma famille** de m'avoir épaulé tout au long de ce périple. Même si mon travail devait vous sembler bien mystérieux, vous n'avez jamais cessé de croire en moi.

Je remercie **Dalaiï**, sans qui le projet nanobodies n'aurait pas été possible. Ta phobie des piques nous a fait vivre quelques moments épiques. Pourtant, tu as su nous donner le meilleur de toi.

Et bien sûr, la meilleure pour la fin, je remercie **Loranne**, qui a été ma lumière tout au long de ce doctorat. Bien que la biologie et la physique soient deux univers bien différents, tu as toujours su faire preuve de compréhension face aux exigences de mon doctorat.

« La science a fait de nous des dieux avant même que nous méritions d'être des hommes »

- Jean Rostand -.

Résumé des travaux de thèse.

L'ADN est constamment la cible de dommages, provenant aussi bien de sources endogènes (propriétés intrinsèques de la macromolécule, métabolisme cellulaire...) qu'exogènes (radiations, contaminants alimentaires...). Parmi ces dommages, les cassures double-brin de l'ADN (CDB) représentent une des lésions les plus cytotoxiques. En réponse à ce danger, la cellule dispose de voies de détection et signalisation impliquant le recrutement de protéines. Au cours de cette réponse des modifications post-traductionnelles de protéines de signalisation et de réparation sont produites au niveau du site de cassure comme, par exemple, la phosphorylation de H2AX, un variant de l'histone H2A. Cette voie de signalisation permet d'une part d'activer les points de contrôle du cycle cellulaire pour stopper la prolifération et, d'autre part, de stimuler les systèmes de réparation de CDB afin de restaurer l'intégrité de l'ADN. Une réparation infidèle des CDB peut aboutir à des additions/délétions de bases, voir des réarrangements chromosomiques, à l'origine de cancers. Ainsi, élucider les causes et les mécanismes responsables de la formation des CDB en réponse à des stress génotoxiques et suivre leur prise en charge par la cellule sont des éléments importants pour la compréhension de la génotoxicité.

Des techniques permettant d'analyser la formation des CDB (immunofluorescence, électrophorèse en champs pulsé, COMET neutre...) existent, mais elles ne permettent d'analyser l'état de l'ADN qu'à un instant fixe. La première partie de mon travail de thèse a été de créer un outil innovant, permettant de détecter et suivre la formation de CDB en temps réel, sur cellules vivantes. Cet outil repose sur la technologie des nanobodies, anticorps monochaines produits uniquement chez les *camélidés* et certains requins. Nous avons fait exprimer un nanobody intracellulaire dirigé contre H2AX phosphorylé (appelé YH2AX), qui semble se relocaliser aux CDB créées par microirradiation. La création de cet outil a nécessité l'immunisation d'un lama avec le peptide phosphorylé et l'isolement/le clonage des séquences codantes des nanobodies afin de produire une banque. Les nanobodies spécifiques de YH2AX ont été sélectionnés par phage display et leurs séquences ont été exprimées en cellules humaines, fusionnées à un fluorophore afin d'observer leur relocalisation aux CDB en temps réel.

La seconde partie de ma thèse a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action d'une génotoxine bactérienne, responsable de cancers en modèle murin : la *Cytolethal Distending Toxin* (CDT). Cette toxine, sécrétée par des bactéries commensales et pathogènes, se localise au noyau des cellules cibles et provoque des CDB. Si le fonctionnement de cette toxine était préalablement décrit comme celui d'une nucléase produisant des CDB directes, mon travail a montré que pour des concentrations équivalentes à la Dose Létale 50, CDT produit d'abord des cassures simple-brin qui dérivent en CDB au cours de la réplication de l'ADN. De plus, la réparation de ces CDB par recombinaison homologue est cruciale pour la survie des cellules exposées à CDT.

En conclusion, mon travail de thèse a permis d'une part de développer un outil innovant permettant d'analyser la dynamique en temps réel des CDB en cellules humaine et, d'autre part, d'éclaircir le mécanisme menant à la génotoxicité de CDT, toxine représentant un risque potentiellement cancérogène chez les mammifères. Les apports de ces travaux sont discutés ici.

**Abstract : Real-time biomarker of DNA double-strand breaks
and Cytotoxic Distending Toxin genotoxicity**

Human DNA is constantly damaged by endogenous (cellular metabolism) or exogenous (radiations, food contaminants) sources. Among these lesions, DNA double-strand breaks (DSB) are the most cytotoxic. To survive to these lesions, a cellular pathway is in charge for the detection and the signaling of DSB. This pathway involves recruitment and post-translational modifications of several proteins around the DSB site (like the phosphorylation of a H2A histone variant called H2AX). This signalization pathway elicits cellular checkpoints in order to stop proliferation, and stimulates DSB repair systems in order to restore DNA initial integrity. An error-prone repair of DSB can lead to base additions/deletions, or chromosomal aberrations that can induce cancer. In order to understand genotoxicity, it is important to elucidate causes and mechanisms responsible for DSB formation and to follow their management by the cell.

Techniques allowing DSB formation analysis (immunofluorescence, pulse-field gel electrophoresis, neutral COMET assay...) exist, but can only show DNA state for a given point. During the first part of my thesis work, I created a new tool to detect and follow DSB formation in real time, in human cells. This tool rely on nanobody technology, which are miniatures antibodies produced by *camelidae* species and some sharks. An intracellular nanobody directed against phosphorylated H2AX (YH2AX) has been expressed, and seems to relocate to microirradiation-induced DSB. In order to build this tool, anti-YH2AX peptides were designed to immunize a llama, and nanobodies coding sequences were isolated/cloned and gathered as a library. Nanobodies specific for YH2AX were selected by phage display. Fused to a fluorophore these nanobodies were expressed in human cells in order to analyze their relocalization to DSB in real time.

The second part of my PhD shed a new light on the mechanism of action of a bacterial génotoxine causing cancers in mouse models: *the Cytotoxic Distending Toxin* (CDT). This toxin is secreted by commensal and pathogenous bacteria, translocate into the nucleus of targeted cells and induces DSB. CDT mechanism of action was previously described as those of a nuclease inducing DSB. But my work demonstrated for lower doses (equivalent to lethal dose 50), that CDT induced first single-strand breaks leading to double-strand breaks through DNA replication. Moreover, homologous recombination repair of these DSB is crucial in order for cells exposed to CDT to survive.

In conclusion, thanks to my thesis work, I developed a new tool to analyze real time dynamic of DSB in human cells in one hand. And in another hand, my work shed a new light on the mechanism of action of CDT genotoxicity, a toxin displaying cancer hazard in mammals. Contributions brought by this work are discussed here.

Remerciements	2
Résumé des travaux de thèse.....	6
Glossaire.....	24
Introduction.....	28
I. Les dommages à l'ADN.....	30
1) Les sources de dommages à l'ADN.....	30
a. Altérations de bases d'ADN.....	30
b. Dommages encombrants	32
c. Pontages inter-brin	34
d. Mésappariements de bases.....	36
e. Cassures double-brin de l'ADN	38
2) Les dommages réplcatifs.....	38
a. Rappels sur la réplication de l'ADN	40
b. Topologie de l'ADN pendant la réplication	42
c. Les dommages perturbant la réplication	44
d. Le point de contrôle de la phase S (checkpoint intra-S).....	46
e. Prise en charge des lésions bloquant la réplication	52
3) Les cassures double-brin de l'ADN.....	58
a. Origines des cassures double-brin:	58
➤ Les espèces réactives de l'oxygène.....	58
➤ La réplication de l'ADN.....	60
➤ Les enzymes du métabolisme de l'ADN	60
➤ Les radiations ionisantes.....	62
➤ Les génotoxines.....	64
b. Voies de réponses cellulaires aux cassures double-brin	64
➤ Détection de la cassure double-brin	66

➤ Signalisation de la cassure double-brin.....	68
➤ Les points de contrôle en réponse aux cassures double-brin.....	70
➤ Sénescence et apoptose induites par les cassures double-brin	72
➤ Autres modifications post-traductionnelles liées aux cassures double-brin	76
➤ Remodelage de la chromatine proche de la cassure double-brin	78
4) Réparation des cassures double-brin	78
a. La jonction d'extrémités non-homologues.....	78
➤ La jonction d'extrémités non-homologues classique (C-NHEJ).....	80
➤ La jonction d'extrémités non-homologues alternative (alt-NHEJ).....	82
b. La recombinaison homologue	84
c. Choix du système de réparation des cassures double-brin.....	92
➤ Influence du cycle cellulaire sur la résection et la réparation	94
➤ 53BP1 et BRCA orientent la réparation par NHEJ ou par RH	96
➤ 53BP1 favorise la NHEJ et inhibe la RH	96
➤ BRCA1 favorise la RH et inhibe la NHEJ.....	100
➤ Les rôles antagonistes de 53BP1 et BRCA1	102
5) Mutations et instabilité génétique	104
a. L'instabilité génomique comme moteur du cancer	106
b. L'instabilité nucléotidique	108
c. L'instabilité de séquences répétées.	108
d. L'instabilité chromosomique	110
6) L'importance de prévenir la génotoxicité	112
II. Les Nanobodies comme marqueurs de cassures double-brin.....	114
1) Comment détecter les CDB ?.....	114
a. Les essais directs	114
b. Les essais indirects	114
➤ Test d'échange des chromatides sœurs.....	116
➤ Test des micronoyaux	116
➤ Test des aberrations chromosomiques.....	116
➤ Analyse des marqueurs de CDB	118
➤ Utilisation de γ H2AX en thérapies anti-cancéreuses.....	120
➤ Limites.....	122

2) Les anticorps chaînes lourdes de camélidés	124
a. Le répertoire immunitaire original des lamas.....	124
➤ Les anticorps chaînes lourdes	124
➤ Fragment variable de chaîne lourde (VHH ou Nanobody)	128
b. Nanobodies/VHH, des anticorps miniaturisés.....	132
c. Nanobodies : un outil multifonctions prometteur.....	132
d. Des nanobodies pour suivre les cassures double-brin en temps réel	136
3) Résultats : Obtention de HCAb anti- γ H2AX.....	136
4) Création d'une banque de VHH.....	138
a. Obtention des ADNc des VHH.....	140
➤ Extraction des ARN totaux	142
➤ Retro-transcription des ARN en ADNc et amplification (PCR-1)	144
➤ Obtention des séquences codantes de VHH (PCR-2 et 3).....	148
b. Clonage des ADNc de VHH en plasmide : création de la banque.....	152
5) Sélection d'un nanobody anti- γ H2AX.....	156
a. Phage display : principe	156
b. Phage display : stratégies	158
c. 1^{er} tour de phage display	158
➤ Préparation de γ H2AX-Chitin Binding Domain sur billes de chitine	158
➤ 1 ^{ère} sélection de phages-VHH anti γ H2AX.....	162
d. 2^{ème} tour de phage display.....	164
➤ Préparation de γ H2AX-strep-tag sur billes de strep-Tactin	164
➤ 2 ^{ème} sélection de phage-VHH anti- γ H2AX.....	166
e. Analyse des sous-banques 2 et 3	168
6) Crible d'un intrabody recruté aux CDB	170
7) Procédures expérimentales	172
Immunisation du lama.....	172
Isolement des lymphocytes à partir du sang total de lama	174
Extraction d'ARN totaux	174
Rétro-transcription des ARN en ADNc.....	176
PCR pour la création de la banque	176
Purification d'ADN.....	178
Digestion des produits de PCR-3 par PstI/NotI.....	180

Ligation des inserts VHH digérés PstI/NotI en pHEN4.....	180
Production de bactéries électrocompétentes et électroporation	180
Phage display.....	182
Culture cellulaire et transfection.....	184
Extraction d'histones et fixation des protéines de fusion sur billes	184
8) Discussion / Perspectives.....	186
a. Le marquage γH2AX comme preuve de concept	186
➤ Le signal γ H2AX ne marquerait pas que les CDB	186
➤ Le signal γ H2AX marquerait des CDB indirectes.....	188
b. Comparaison avec les biomarqueurs de CDB existants.....	190
➤ Le système rapporteur γ H2AX/MDC1-luc2	190
➤ Radio-immunoconjugués anti- γ H2AX.....	192
c. Améliorer le GFP-VHH.....	194
➤ Analyser le recrutement du nanobody face à d'autres sources de CDB.....	194
d. Autres utilisations potentielles de Nanobodies anti-γH2AX.....	198
➤ Utilisation in cellulo en temps réel	198
➤ Utilisation in vitro.....	198
➤ Traqueur in vivo	202
III. Etude d'une génotoxine : CDT	206
1) Les toxines bactériennes.....	206
a. Les cyclomodulines.....	206
b. Les génotoxines bactériennes	208
c. La <i>Cytolethal Distending Toxin</i>	208
➤ Fixation de CDT à la membrane plasmique	210
➤ Entrée et trafic de CDT dans la cellule	212
➤ Translocation nucléaire de CDT	214
➤ Activité génotoxique de cdtB, modèle actuel	216
➤ CDT et mort cellulaire	218
➤ L'instabilité génétique induite par CDT.....	220
➤ L'action de CDT in vivo	220
➤ Contradictions avec le modèles actuel : problématique	222
2) Article : Des cassures simple-brin aux cassures double-brin pendant la phase S : un nouveau mode d'action de la <i>Cytolethal Distending Toxin</i> d'E.coli.....	224

➤ Figures supplémentaires :	256
3) Résultats additionnels	264
a. Validation de l'essai COMET	264
b. L'effet de CDT sur une lignée fonctionnelle pour p53.....	264
c. Un marqueur de stress réplicatif : les 53BP1 <i>nuclear bodies</i>	268
4) Procédures expérimentales additionnelles.....	270
Synchronisation en mitose : bloc thymidine-nocodazole	270
5) Discussion / Perspectives.....	272
a. Préciser l'activité DNase de cdtB	272
b. Etudier les voies de réponses aux dommages activées par CDT.....	274
c. La réparation des dommages causés par CDT	274
➤ La réparation post rélicative	274
➤ La réparation par NHEJ à fortes doses	276
➤ Le rôle de la recombinaison homologue.....	276
d. L'effet de CDT sur les cellules en prolifération in vivo	278
➤ CDT dans l'intestin	280
➤ CDT dans l'estomac.....	280
➤ CDT dans le foie	282
IV. Conclusion générale	286
V. Références.....	290

Figure 1. Les types de dommages à l'ADN, leurs origines et leurs réparations.	29
Figure 2. Représentation de la fourche de réplication.	39
Figure 3. Torsions de l'ADN liées à la réplication.	41
Figure 4. Réparation/Tolérance des dommages bloquant la réplication.	51
Figure 5. Schéma de la réponse aux cassures double-brin.	63
Figure 6. La voie de réponse aux cassures double-brin de l'ADN.	65
Figure 7. Le cycle cellulaire et ses points de contrôle.	69
Figure 8. Le télomère et le complexe <i>Shelterin</i>	73
Figure 9. Modèle de réparation des CDB par C-NHEJ.	79
Figure 10. La réparation par recombinaison homologue (1ère partie).	85
Figure 11. La réparation par recombinaison homologue (2ème Partie) : DSBR et SDSA.	89
Figure 12. Les caractéristiques classiques des cellules cancéreuses.	105
Figure 13. Test d'échange de chromatides soeurs.	115
Figure 14. Test des micronoyaux.	115
Figure 15. Tests d'aberrations chromosomiques.	117
Figure 16. Exemple de marqueurs de cassures double-brin.	117
Figure 17. Différences entre anticorps conventionnels, HCab, et Nanobodies.	125
Figure 18. Comparaison des domaines VH et VHH.	127
Figure 19. Utilisation des nanobodies pour traquer des protéines intracellulaires (intrabodies).	133
Figure 20. Protocole d'immunisation du lama avec le phosphopeptide H2AX.	135
Figure 21. Evaluation de l'efficacité de l'immunisation contre le phosphopeptide H2AX.	137
Figure 22. Mise au point de l'extraction d'ARN totaux à partir de lymphocytes isolés.	141
Figure 23. Création de la banque de VHH.	143
Figure 24. Mise au point de la PCR-1.	145
Figure 25. Mise au point de la PCR-2.	147
Figure 26. Mise au point de la PCR-3.	149
Figure 27. Mise au point de la ligation des ADNc VHH en phagemide pHEN4.	151
Figure 28. Totalité des boîtes de Petri utilisées pour la banque de VHH.	151
Figure 29. Alignement d'ADNc de 40 VHH de la banque.	153
Figure 30. Production de phages-VHH.	155
Figure 31. Purification de γ H2AX-CBD sur les billes de chitine.	157
Figure 32. 1 ^{er} tour de sélection des phages-VHH anti γ H2AX par phage display.	161
Figure 33. Purification de γ H2AX-strep-tag sur billes de strep-Tactin.	163
Figure 34. 2 ^{ème} tour de phage display pour la sélection de phages anti γ H2AX.	165
Figure 35. Clones des sous banques issues du 2 nd tour de phage display.	167

Figure 36. Les fluobodies se relocalisent en temps réel aux CDB induites par microirradiation.....	171
Figure 37. Principe du DNA shuffling.	195
Figure 38. Applications d'un nanobody anti- γ H2AX	197
Figure 39. Les effets de toxines bactériennes sur le métabolisme cellulaire.	205
Figure 40. Structure 3D du complexe CDT.	209
Figure 41. Modèle actuel : mécanisme d'intoxication par CDT.	211
Figure 42. L'exposition à CDT à des temps précoces n'affecte pas la viabilité des cellules HeLa.....	263
Figure 43. CDT induit une perturbation de la phase S différente entre HT1080 et HeLa.....	263
Figure 44. Influence du checkpoint G1/S dans la réponse à CDT.	265
Figure 45. Recrutement de RAD51 dans les HT1080 en réponse à CDT.	267
Figure 46. Formation de 53BP1 <i>nuclear bodies</i> en réponse à CDT.	269
 Tableau 1. Les protéines de la C-NHEJ, fonctions et syndromes associés.	 80
Tableau 2. Les protéines de la RH, fonctions et syndromes associés	91

Glossaire

53BP1 : p53 Binding Protein 1
ABRA1 : Actin-Binding Rho-Activating protein 1
Alt-NHEJ : NHEJ Alternative
A-T : Ataxia Telangectasia
AT-LD : Ataxia Telangectasia-Like Disorder
ATM : Ataxia Telangectasia Mutated
ATR : Ataxia Telangectasia and RAD3 related
APAF : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
BAX : Bcl-2–Associated X protein
BCL : B-Cell Lymphoma
BER : Base Excision Repair
BLM : Bloom
BRCA : BReast Cancer Associated protein
BRCT : BRCA1 C-Terminus
BRE : Brain and Reproductive organ-Expressed protein
CBD : Chitin Binding Domain
CDB : Cassure Double-Brin
CDC : Cell Division Cycle
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CDR : Complementarity Determining Region
CH : Heavy Chain
CHK : CHeckpoint Kinase
CNF : Cytotoxic Necrotizing Factor
C-NHEJ : NHEJ Classique
CSB : Cassure Simple-Brin
CtIP : C-terminal Binding Protein Interacting Protein
DFF40 : DNA Fragmentation Factor, 40-kd subunit
D-loop : Displacement loop
DNA-PKcs : DNA-Dependent Protein Kinase catalytic subunit.
DNT : DermoNecrotic Toxin
DSBR : Double Strand Break Repair
EME1 : Essential Meiotic Endonuclease 1
EXO1 : Exonucléase 1
FA : Fanconi Anemia
FACT : FAcilitates Chromatin Transcription
FEN-1 : Flap EndoNuclease-1
FHA : Fork Head Associated
GFP : Green Fluorescent Protein
H2AX : Variant X de l'histone H2A
HCAb : Heavy Chain Antibody
HERC2 : HECT domain and RCC1-like domain-containing protein 2
HTLF : Human T-cell Leukemia virus enhancer Factor
KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin
MCM : Mini Chromosome Maintenance complex
MDC1 : Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
MiniSOG : Mini Single Oxygen Generator
MMR : MisMatch Repair
MRN : MRE11-RAD50-NBS1 complex
MUS81 : MMS and UV-sensitive protein 81

NBA1 : New component of the BRCA1-A complex
NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome protein 1
NER : Nucleotid Excision Repair
NHEJ : Non-Homologous End Joining
NLS : Nuclear Localization Signal
p53 : tumor Protein 53 kDa
PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2
PAR : Poly-ADP Ribose
PARP : Poly-ADP Ribose Polymerase
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
pH2AX : phosphopeptide H2AX
PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT
PI-3K : Phosphatidylinositol 3'Kinase
PIII/G3P : capsid Gene 3 Product
PMT : Pasteurella Multocida toxin
POT1 : Protection Of Telomeres
PP2A : Protein Phosphatase 2A
pRb : Retinoblastoma protein
PRR : Post-Replication Repair
PUMA : P53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis
RAP1 : Repressor Activator Protein 1
RAP80 : Receptor-Associated Protein 80
RFC : Replication Factor C
RFP : Red Fluorescent Protein
RH : Recombinaison Homologue
RIR : Réparation des pontages inter-brins Indépendante de la Réplication
RNF : Ring Finger protein 8
RTEL : Regulator of Telomere Elongation helicase 1
RPA : Replication Protein A
SCE : Sister Chromatid Exchange
SCFS : SKP1–CUL1–F-box protein ligase
SDSA : Synthesis-Dependent Strand Annealing
SFR1 : SWI5-dependent recombination repair 1
siRNA : small interfering RNA
SLX : Synthetic lethal of unknown function protein
SVF : Sérum de Veau Foetal
TIN2 : TRF1-Interacting Nuclear factor 2
TIP60 : 60 kDa Tat Interactive Protein
TLS : Translesion Synthesis
TERT : TElomerase Reverse Transcriptase
TOP : TOPoisomerase
TRF : Telomeric Repeat-binding Factor
UBC13 : Ubiquitin-Conjugating enzyme 13
UV: UltraViolet
VH : Variable domain of Heavy chain
VHH : Variable domain of HCAb Heavy chain
VL : Variable domain of Light chain
WIP1 : Wild-Type p53-Induced Phosphatase
WRN : Werner
XLF : XRCC4-Like Factor
XRCC : X-Ray Cross Complementing

Introduction

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à la création d'un outil permettant la détection des cassures double-brin (CDB) de l'ADN en temps réel. C'est un système *in cellulo*, apportant une dimension temporelle dans le suivi des CDB. J'ai également étudié une génotoxine bactérienne, la *Cytolethal Distending Toxin* (CDT), dont le potentiel carcinogène été démontré chez la souris (Ge *et al.*, 2007, Fox *et al.*, 2004). D'une part, mon travail conduit à une meilleure compréhension de son mécanisme d'action. D'autre part, il a permis d'expliquer certains aspects de la toxicité cellulaire associée à cette toxine.

Ainsi je présenterai dans une première partie les sources de dommages à l'ADN, les mécanismes de réparation en me focalisant plus particulièrement sur les CDB, dans une deuxième partie les nanobodies (anticorps miniatures utilisés pour détecter les CDB) avec les résultats obtenus, et dans une 3e partie la toxicité de la CDT avec les résultats afférents dont une partie est rapportée dans le journal *Cellular Microbiology*.

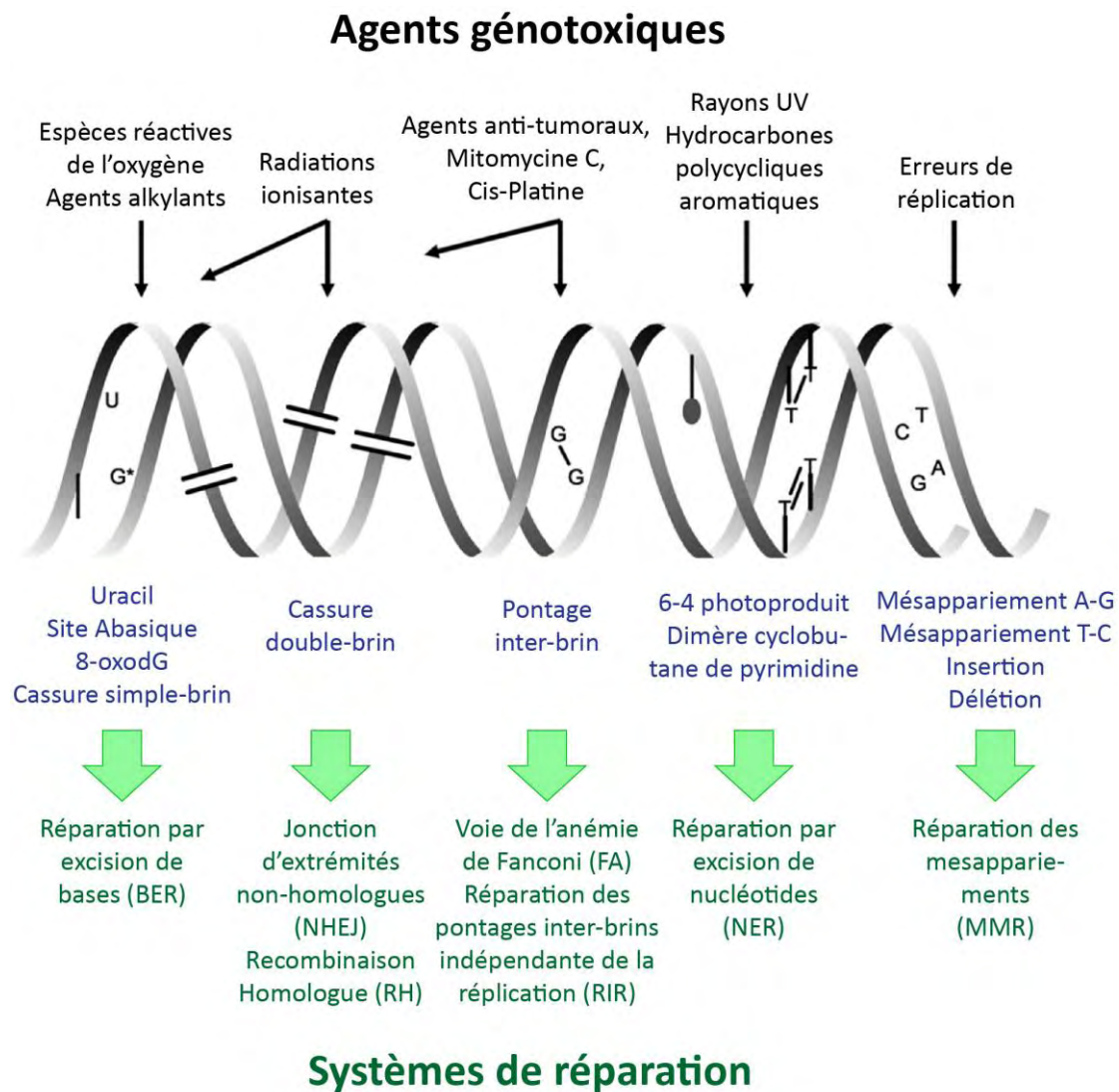


Figure 1. Les types de dommages à l'ADN, leurs origines et leurs réparations.
Adapté de Diderich *et al.*, 2011 .

I. Les dommages à l'ADN

1) Les sources de dommages à l'ADN

On estime qu'en absence de stress exogène, chaque cellule fait face, chaque jour, à des milliers de dommages à l'ADN (Lindahl, 1993). Sachant qu'un individu est constitué de plus de 10^{13} cellules, l'organisme doit donc quotidiennement faire face à un nombre astronomique de dommages. Toutes ces altérations représentent un danger certain pour les cellules, car elles altèrent la structure même de la double hélice d'ADN et peuvent perturber les processus métaboliques de l'ADN (transcription, réplication) avec la possibilité d'induire des mutations. Les modifications toxiques endogènes de l'ADN sont principalement le résultat de la stabilité de l'ADN (par exemple sites abasiques observés spontanément), d'oxydation ou de perturbation de la réplication et de la division cellulaire. Les agents exogènes provoquant des dommages à l'ADN peuvent être classés en 3 catégories :

- les agents physiques : les rayonnements (ionisants ou ultraviolets).
- les agents chimiques : la pollution (atmosphérique, environnementale), les contaminants alimentaires, les substances utilisées en chimiothérapies...
- les agents biologiques : les virus, les génotoxines bactériennes ou fongiques...

Ces agents produisent un éventail de dommages à l'ADN, auxquels la cellule doit faire face. Afin d'éviter que ces lésions ne compromettent l'information génétique, des systèmes de réparation, adaptés à chaque type de dommage, sont retrouvés des bactéries aux eucaryotes supérieurs (Figure 1).

a. Altérations de bases d'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène (produit du métabolisme cellulaire ou consécutives à des radiations ionisantes, voir chapitre I. 3) a.) ainsi que les agents alkylants (contenus dans certains traitements anti-cancéreux) provoquent des

modifications chimiques de certaines bases de l'ADN. Ces modifications incluent entre autre la conversion de guanines en 8-oxo-2'-deoxyguanosines (8-oxodG), la formation de thymidines glycol ou de cyclopurines, le transfert de groupes alkyl (alkylation), le détachement pur et simple des bases de la double-hélice (sites abasiques) ou des cassures simple- et double-brin (Diderich *et al.*, 2011). Ces altérations chimiques modifient la capacité de la base à se lier avec sa base complémentaire. Si cette base n'est pas « réparée », elle peut conduire à une erreur pendant la réplication et produire alors une mutation ponctuelle. Le système de réparation majoritaire de ce genre de lésion est la réparation par excision de bases (*Base Excision Repair*, BER). Brièvement, des enzymes du BER, les glycosylases, sont capables de reconnaître les bases endommagées et de les exciser. Elles sont remplacées par les bases complémentaires à celles de la matrice lors de la réplication réparatrice, et le brin d'ADN est relié pour en restaurer sa continuité. La déficience de protéines impliquées dans le BER ne conduit généralement pas à un phénotype en raison de la redondance des activités. Néanmoins il existe quelques exemples pour lesquels une altération du processus BER peut conduire à un défaut de réparation de ces lésions et donc à des mutations : par exemple, le syndrome myélodysplasique, caractérisé par des cytopénies et une propension à développer des leucémies aigües myéloïdes (Jankowska *et al.*, 2008). Une mutation sur la cystéine 326 d'OGG1 (glycosylase du BER) est partagée par une partie des patients et serait à l'origine de l'accumulation de bases endommagées (8-oxoguanines essentiellement, Jankowska *et al.*, 2008).

b. Dommages encombrants

L'ADN peut également subir d'autres types de dommages : ces lésions sont dites « encombrantes » (*Bulky lesions*) (Figure 1). Il peut s'agir de liaisons covalentes entre plusieurs bases d'un même brin, comme après exposition aux rayons UV, qui conduit à la formation de dimères cyclobutanes de pyrimidines et des photoproduits pyrimidine-(6,4)-pyrimidone. De plus, l'exposition à certains hydrocarbures aromatiques polycycliques –tel que le Benzopyrène, présent dans les gaz d'échappements, fumée de cigarette ou de barbecue– provoque des adduits sur l'ADN, qui sont également des

lésions encombrantes. Ces types de lésion sont pris en charge par la réparation par excision de nucléotides (*Nucleotide Excision Repair*, NER). La lésion est détectée et le brin d'ADN endommagé est excisé sur une longueur de l'ordre d'une dizaine de nucléotides chez les bactéries et d'une trentaine chez les eucaryotes. La séquence excisée est ensuite resynthétisée par réplication afin de restaurer l'information génétique initiale. Curieusement, la déficience de protéines du NER ne conduit pas systématiquement au même syndrome. En effet, le NER se décompose en deux sous-voies, l'une intervenant sur toutes les séquences du génome (*global genomic repair*), l'autre intervenant essentiellement pendant la transcription (*transcription-coupled repair*). Si une protéine de la *global genomic repair* est déficiente, la personne est atteinte de *Xeroderma pigmentosum* (ou maladie des enfants de la lune, car présentant une très haute sensibilité aux UV, avec une propension importante à développer des cancers (Robbins *et al.*, 1974)). Une déficience portant sur une protéine de la *transcription-coupled repair* conduit au syndrome de Cockayne (retard de croissance couplé à un défaut de développement du système nerveux, photosensibilité et vieillissement prématuré (Cockayne, 1936)). La trichothiodystrophie (retard mental associé à des cheveux cassants) est également associée à des défauts du NER, mais l'étiologie exacte est plus complexe, étant donnée qu'elle impliquerait des protéines de la *global genomic repair* et de la *transcription-coupled repair* (Lehmann, 2001, Kamileri *et al.*, 2012).

c. Pontages inter-brin

La dimérisation de deux bases peut également se faire entre les deux brins d'ADN de la double-hélice (Figure 1) : on parle alors de pontages inter-brin. Certains agents, comme le cis-platine ou la mitomycine C, sont utilisés en thérapie anticancéreuse pour induire ces pontages inter-brins et tuer les cellules cancéreuses. Si d'autres agents pontants ont été utilisés comme arme chimique de la 2^{ème} guerre mondiale (gaz moutarde, Goodman *et al.*, 1946), beaucoup se retrouvent dans notre environnement, tels la fumée de cigarette, des gaz d'échappement (aldéhydes) ou encore sont produits par notre corps, comme certains aldéhydes ou lipides peroxydés.

Ces agents représentent un danger pour les cellules saines car ces pontages peuvent bloquer la réplication et la transcription en empêchant la séparation des brins d'ADN. Deux systèmes de réparation dédiés sont chargés de réparer ces pontages. La voie de l'anémie de Fanconi (FA) répare essentiellement ces pontages pendant la réplication, en favorisant l'intervention de la recombinaison homologue (RH) au niveau de ces lésions. D'ailleurs certaines protéines de la voie de la FA sont des protéines de la RH, telles FANCD1 (appelé BRCA2 dans la RH), FANCO (SLX4), FANCN (PALB2), FANCB (RAD51C). Le fonctionnement des protéines de la RH est développé dans le chapitre I. 4) b.). La déficience de la voie de la FA a donc des conséquences sur les cellules répliquatives, comme celles du sang ou de certains épithéliums, qui meurent ou subissent des réarrangements chromosomiques. C'est pourquoi, l'anémie de Fanconi est caractérisée par une pancytopenie, des malformations congénitales et une prédisposition à certains cancers tels la leucémie aigüe myéloïde et des cancers des voies aérodigestives (Fanconi, 1927). Le deuxième système de réparation des pontages inter-brins est la réparation indépendante de la réplication (RIR) : elle se produit dans toutes les phases du cycle cellulaire et impliquerait des protéines du NER (Williams *et al.*, 2012), mais elle est moins bien caractérisée.

d. Mésappariements de bases

Lors de la réplication de l'ADN, le réplisome (développé plus amplement chapitre I. 2) a.) peut incorporer des nucléotides incorrects dans le brin d'ADN néosynthétisé, conduisant à un mésappariement entre ce nucléotide et celui du brin matrice. Bien que rares (on estime qu'1 nucléotide sur 10^5 est incorrectement incorporé par la polymérase epsilon (McCulloch *et al.*, 2008)) ces erreurs sont plus fréquentes et peuvent toucher plusieurs nucléotides sur certaines séquences d'ADN répétées (Fortune *et al.*, 2006), comme les séquences microsatellites plus difficiles à répliquer (les séquences répétées sont développées dans le chapitre I. 5) c.). Des mésappariements peuvent également survenir par l'action de polymérases moins fidèles qui incorporent parfois des nucléotides non complémentaires, comme lors de la synthèse translésionnelle ou la réplication post répliquative (ces deux systèmes sont

développés dans les chapitres I. 2) e.). Enfin, les mésappariements de bases peuvent aussi résulter du processus de RH. Pour faire face à ces erreurs, les cellules possèdent un système de réparation des mésappariement de bases (MMR, Li, 2008). Bien que ce système ait été initialement documenté chez *E.coli*, les études chez les eucaryotes montrent que les protéines du MMR sont capables de reconnaître ces mésappariements spécifiquement sur le brin néosynthétisé. Des endonucléases coupent près de la zone du brin néosynthétisé mésapparié qui est alors dégradé par une exonucléase. Des polymérases sont recrutées pour resynthétiser le brin sans causer de mésappariements et la réaction est terminée par la ligation du nouveau brin pour restaurer la continuité du brin d'ADN.

e. Cassures double-brin de l'ADN

Le clivage des deux brins de la double-hélice d'ADN constitue un évènement dangereux pour la survie de la cellule, car létal s'il n'est pas réparé ou à l'origine de réarrangements chromosomiques en cas de mauvaise réparation. Les cassures double-brin de l'ADN (CDB) ont des sources multiples (les CDB sont développées dans le chapitre I. 3)), dont une partie provient d'évènements néfastes se produisant pendant la réplication de l'ADN. Les dommages réplicatifs sont donc développés en détail dans le chapitre suivant.

2) Les dommages réplicatifs

Les cellules régulent la réplication de leur génome d'une manière extrêmement complexe, assurant une duplication rapide et fidèle de l'information génétique au cours de la phase S. Le contrôle précis de la réplication est important car pendant la phase S, l'ADN est particulièrement sensible aux lésions qui perturbent la réplication et engendrent des mutations et des réarrangements chromosomiques.

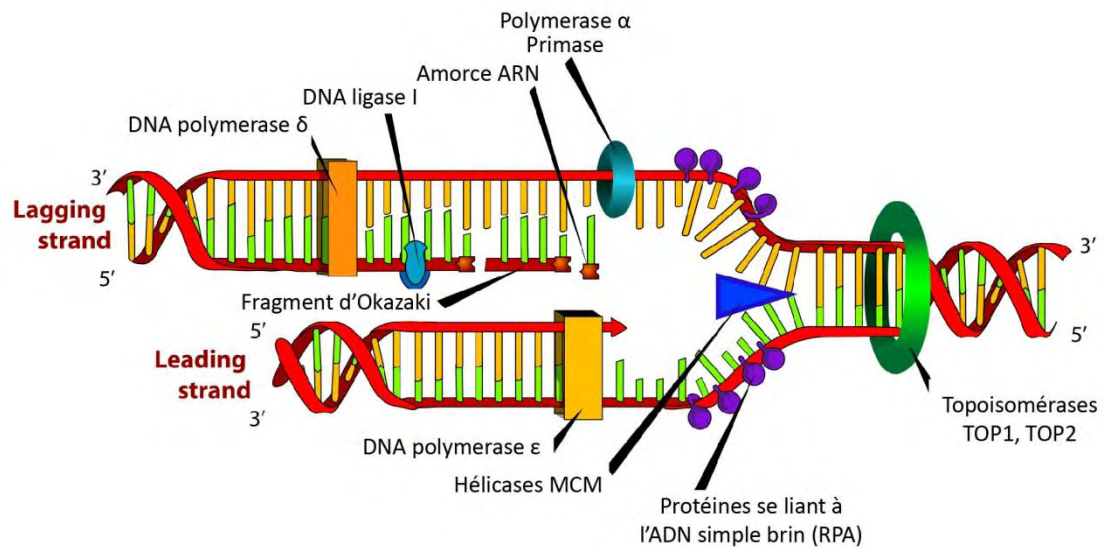


Figure 2. Représentation de la fourche de réplication.

La réplication fidèle de l'ADN nécessite la mise en place du réplisome. Les topoisomérases 1 et 2 (anneau vert) relâchent la tension causée par les super-enroulements précédant la fourche de réplication. La séparation des deux brins matriciels est réalisée par les hélicases du complexe MCM (triangle bleu). Lors de la séparation des brins, le simple-brin est recouvert par RPA (ronds violets). La réplication du brin discontinu (*lagging strand*) se fait par hybridation d'amorces ARN et la polymérase α/primase (anneau bleu). La synthèse du *lagging strand* est effectuée par la polymérase δ (rectangle orange). Le fragment d'Okazaki ainsi synthétisé est lié au fragment précédent par la DNA ligase I. La synthèse du brin continu (*leading strand*) se fait par la polymérase ε (rectangle jaune). Schéma adapté de Ruiz, 2007.

a. Rappels sur la réplication de l'ADN

Beaucoup de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN sont conservées parmi les espèces eucaryotes. Des mutations dans ces protéines conduisent à l'accumulation d'intermédiaires de réplication d'ADN qui déclenchent des processus de recombinaison chromosomiques et de l'instabilité génomique (pour revue, Aguilera *et al.*, 2008). La réplication de l'ADN s'effectue grâce à des complexes multiprotéiques : les réplisomes (Figure 2). Ils sont nécessaires à la formation de fourches de réplication qui progressent le long de la totalité de l'ADN génomique pour le répliquer. Ces réplisomes incluent le complexe hexamérique d'hélicases réplcatives MCM (MCM2 et MCM7). Indispensables à la réplication, elles sont chargées de dérouler l'ADN en amont de la fourche de réplication (Labib *et al.*, 2000), ce qui permet aux facteurs d'élongation du réplisome (les polymérases α , ϵ et δ) de répliquer cet ADN en incorporant les bases complémentaires à celles des brins d'ADN matrice. Ces polymérases sont assistées par des facteurs accessoires : le facteur de réplication C (*Replication Factor C*, RFC) contribue au recrutement de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), qui maintient les DNA polymérases sur le chromosome, permettant une réplication rapide et processive (Stukenberg *et al.*, 1991). La synthèse de l'ADN se faisant par l'ajout de nucléotides en 3' du primer synthétisé par la polymérase α , la réplication est semi-discontinue : il y a un brin leader (*leading strand*, synthétisé par la polymérase ϵ), sur lequel les nucléotides sont continuellement ajoutés au primer initial, et un brin retardé (*lagging strand*, synthétisé par la polymérase δ , en collaboration avec la polymérase α), sur lequel des amorces sont synthétisées et allongées par synthèse d'ADN pour former les fragments d'Okazaki (Figure 2). RFC et PCNA coordonnent le passage de la polymérase α vers la polymérase réplcative δ , et agissent comme plateforme pour recruter FEN-1 (*Flap Endonuclease-1*) et la DNA ligase I, qui murent et liguent les fragments d'Okazaki au fragment précédent (pour revue, Jones *et al.*, 2012).

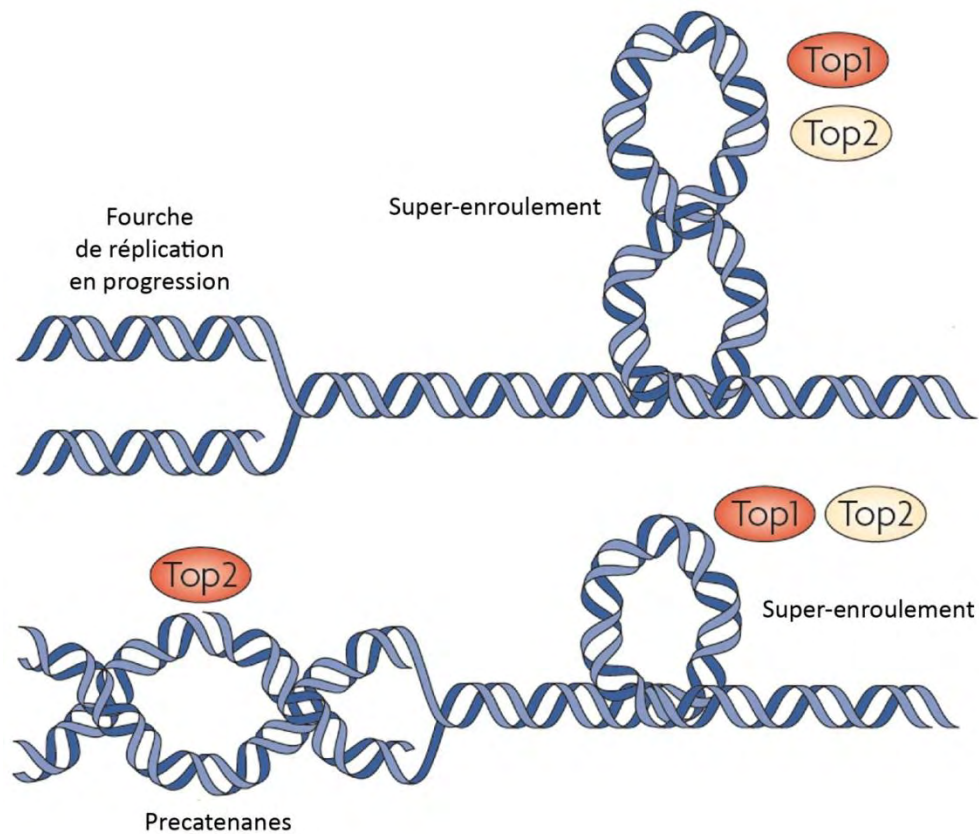


Figure 3. Torsions de l'ADN liées à la réplication.

Les topoisomérases TOP1 et TOP2 enlèvent les super-enroulements se formant devant la fourche de réplication pour supprimer la tension sur l'ADN en cours de réplication. Seul TOP2 enlève les *precatenanes* se formant après le passage de la fourche. Schéma adapté de Branzei *et al.*, 2010

b. Topologie de l'ADN pendant la réplication

Au cours de la phase S, le déroulement du duplex d'ADN induit des différences dans la topologie et la conformation de l'ADN répliqué. La séparation des brins parentaux par les hélicases induit localement la formation d'ADN super-enroulé devant la fourche de réplication, ou encore la formation de *precatenanes* (Figure 3) lorsque les duplexes répliqués s'enroulent derrière la fourche de réplication. La torsion appliquée par la réplication sur n'importe quel segment d'ADN est un stress qui ne peut simplement pas être évacué en faisant pivoter les extrémités des chromosomes, car les chromosomes eucaryotes sont très longs et répliqués par de nombreuses fourches en même temps. Par conséquent, cette tension peut uniquement être soulagée par cassure de l'ADN suivie de sa religation, ce qui est effectué par des nucléases spécialisées appelées topoisomérases (pour revue, Wang, 2002). Les super-enroulements en amont de la fourche de réplication sont enlevés par les topoisomérases de type I (TOP1) et de type II (TOP2), permettant la progression de la machinerie de réplication chez les eucaryotes (Figure 3). En effet, Top1 et Top2 suivent les fourches de réplication chez *S. cerevisiae* (Bermejo *et al.*, 2007). En revanche, les *precatenanes* n'affectent pas le déroulement de la double-hélice par la fourche de réplication. Néanmoins, étant donné que les *precatenanes* enroulent les nouveaux double-brin ADN entre eux, ils compliquent la séparation des deux chromosomes après réplication : ils sont éliminés par des TOP2 uniquement (Figure 3 et Wang, 2002).

Des problèmes supplémentaires surviennent quand deux fourches de réplication fusionnent en fin de réplication : la longueur de l'ADN non-répliqué diminue au fur et à mesure que les deux fourches se rapprochent l'une de l'autre, ce qui augmente drastiquement la tension appliquée par le surenroulement de l'ADN sur cette séquence. Cette tension peut conduire à la cassure des brins d'ADN, ce qui expliquerait pourquoi les régions répliquées tardivement ont tendance à faire des CDB (Mirkin *et al.*, 2007, Casper *et al.*, 2002).

Une autre situation peut survenir durant la réplication, si une fourche de réplication rencontre une « bulle de transcription » ; cela peut provoquer une collision entre le réplisome et les ARN polymérases (associées à la bulle de transcription) et

donc un blocage de la réplication (Deshpande *et al.*, 1996, Azvolinsky *et al.*, 2009, Olavarrieta *et al.*, 2002).

Les blocages de fourches de réplication sont régulièrement associés à une augmentation de la fréquence de recombinaison aux sites bloqués (Lambert *et al.*, 2005, Admire *et al.*, 2006). En effet, si la synthèse d'ADN ne peut repartir, le blocage conduit au désassemblage du réplisome et à l'effondrement de la fourche de réplication, menant à la formation d'une CDB par un mécanisme encore mal élucidé.

En plus de ces obstacles, le génome eucaryote contient d'autres écueils pour la réplication : les sites fragiles, qui sont des loci héréditaires spontanément difficiles à répliquer (Durkin *et al.*, 2007). Ces sites sont des « points chauds » de réarrangements chromosomiques en cas de stress réplicatifs et partagent une caractéristique commune : ils induisent le *pausing* ou bloquent complètement la progression de la fourche, augmentant les risques de produire des séquences non répliquées (des *gaps*) et des CDB. Les séquences répétées (comme les répétitions de di- ou trinuécléotides), inversées, en miroir ou directes peuvent souvent induire la formation de structures d'ADN alternatives, comme les cruciformes, triplex H-DNA, *left-handed Z-DNA* et *slipped-strand S-DNA*, qui inhibent la réplication (pour revue, Mirkin *et al.*, 2007). On distingue deux types de sites fragiles : les sites communs, qui sont présents chez tous les individus, qui contiennent souvent des séquences riches en AT et qui ne présentent pas d'instabilité (expansion ou réduction de la taille de ces séquences au fil des divisions). Les sites rares en revanche, sont directement associés à des maladies génétiques héréditaires (pour revue, Mirkin, 2006). Ils peuvent contenir des séquences riches en GC et/ou des séquences répétées (microsatellites) et sont particulièrement instables (pour revue, Debatisse *et al.*, 2012).

c. Les dommages perturbant la réplication

En plus des obstacles inhérents à la nature de l'ADN eucaryote, des dommages à l'ADN peuvent également perturber la fourche de réplication, et potentiellement aboutir à des CDB puis des aberrations chromosomiques. Ces dommages incluent

notamment les lésions encombrantes, les cassures simple-brin (CSB) et les pontages interbrins, évoquées dans les chapitres I. 1) a. et c. Enfin, un autre paramètre influe fortement sur la progression de la fourche de réplication : la concentration en déoxyribonucleotides (dNTPs). En effet, la présence en excès de l'un des 4 dNTPs ou l'absence de dNTPs par perturbation de la chaîne de synthèse des dNTPs affecte la progression de la fourche de réplication (Sanchez *et al.*, 2012, Bianchi *et al.*, 1986). Ceci peut se produire si l'une des enzymes de la voie de synthèse des dNTPs est mutée (Sanchez *et al.*, 2012) ou si la ribonucléotide réductase est inhibée (par l'hydroxyurée par exemple (Bianchi *et al.*, 1986)). L'activité éditrice (*proofreading*) des polymérases leur permet de tester l'interaction entre le nucléotide ajouté et le nucléotide matrice. Si les deux nucléotides ne sont pas complémentaires, le nucléotide ajouté est remplacé par un autre et re-testé jusqu'à ce que le nucléotide complémentaire soit trouvé. Si le dNTP complémentaire au nucléotide de la matrice est absent ou trop rare, le réplisome est incapable de poursuivre la polymérisation de l'ADN à cause de cette activité *proofreading*.

La perturbation de la fourche de réplication par l'un de ces facteurs peut conduire à un découplage des activités hélicases et polymérases, les hélicases continuant de générer de longs segments d'ADN simple-brin, alors que les polymérases sont à l'arrêt (Byun *et al.*, 2005, Walter *et al.*, 2000). Cette situation met encore une fois en péril la stabilité de la fourche, et le redémarrage de la réplication nécessite des mécanismes spécialisés (point développé plus loin, chapitre I. 2) e.).

d. Le point de contrôle de la phase S (checkpoint intra-S)

En réponse aux stress réplcatifs pouvant provoquer des effondrements de fourches de réplication, la cellule possède un point de contrôle de la phase S (checkpoint intra-S), chargé d'adapter la progression de la réplication. Des senseurs sont mobilisés pour détecter, transmettre et amplifier la signalisation des dommages ou un signal de stress réplcatif, conduisant à l'activation du checkpoint intra-S. Ce checkpoint est différent des checkpoints G1/S ou G2/M qui stoppent la cellule à la transition de deux phases du cycle (développés dans le chapitre I. 3) b.)

3) b.) : le checkpoint intra-S ralentit les fourches de réplication et influencerait sur le départ d'autres origines de réplication. Lorsque l'un des multiples événements cités ci-dessus induit le découplage des polymérases réplcatives et des activités hélicases (Byun *et al.*, 2005, Walter *et al.*, 2000), de longues séquences d'ADN simple-brin sont générées. La protéine RPA (*Replication Protein A*), qui possède une forte affinité pour l'ADN simple-brin, est l'un des premiers senseurs du checkpoint intra-S. Une fois liée à l'ADN simple-brin, RPA active la kinase du checkpoint ATR (*Ataxia Telangectasia mutated and Rad3-related*) via son partenaire ATRIP (*ATR-Interacting Protein*) (Zou *et al.*, 2003). La perte d'ATR ou d'autres composants de la voie ATR est létale à l'état embryonnaire, et des mutations hypomorphes peuvent causer des défauts de croissance et de développement, tel que le syndrome ATR-Seckel (O'Driscoll *et al.*, 2003, O'Driscoll *et al.*, 2007). La kinase ATR activée phosphoryle un grand nombre de cibles impliquées dans la signalisation du checkpoint, dans la réparation de l'ADN et dans l'apoptose, telle que CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*), H2AX (variant de l'histone H2A, Ward *et al.*, 2001) et p53 (Tibbetts *et al.*, 1999). Un des rôles importants d'ATR dans le checkpoint intra-S est la phosphorylation et l'activation de la kinase CHK1 (Guo *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2000), qui est favorisée par plusieurs autres facteurs de la réplication et du checkpoint, incluant RAD9, RAD17, TOPBP1 (*TOP (DNA) II-binding protein 1*), la claspine et le complexe TIM (homologue de *timeless*)/TIPIN (*TIMELESS-interacting protein*) (Furuya *et al.*, 2004, Kumagai *et al.*, 2000, Unsal-Kacmaz *et al.*, 2005, Unsal-Kacmaz *et al.*, 2007, Zou *et al.*, 2002).

Le checkpoint intra-S régule la réplication de l'ADN par plusieurs aspects :

- d'une part, par la stabilité des fourches. En effet, CHK1 est crucial pour éviter l'effondrement des fourches de réplication, en présence et en absence de stress. L'absence de CHK1 en cellules humaines conduit à la formation de CDB consécutives à des fourches instables (Syljuasen *et al.*, 2005).

- d'autre part, par un ralentissement des réplisomes dépendant du checkpoint intra-S en réponse à des dommages à l'ADN. ATR, en coordination avec ATM, appliquerait un rétrocontrôle directement sur les réplisomes. Ce mécanisme est

encore mal connu, mais il pourrait impliquer la phosphorylation par ATM et ATR des hélicases du complexe MCM (Cortez *et al.*, 2004).

- enfin, en cas de stress réplcatif, le checkpoint intra-S opèrerait une régulation globale sur les origines de réplcation du noyau. Durant la réplcation de l'ADN, l'activation séquentielle des origines de réplcations est finement régulée par les protéines du checkpoint chez la levure et l'Homme. Dans des conditions normales, les origines précoces sont celles qui initient la réplcation, tandis que des origines tardives se déclenchent alors que la phase S est déjà avancée, les origines dormantes pouvant ne jamais s'activer. CHK1 activé phosphoryle et inhibe les phosphatases CDC25-A et CDC25-C, ce qui inhibe le complexe Cycline-A/CDK2 et empêche la libération de E2F, facteur de transcription favorisant la poursuite de la prolifération (Maidland, 2000). Le checkpoint maintient CDK2 sous sa forme inactive. Or, l'activité kinase de CDK2 est nécessaire pour phosphoryler CDC45 et activer de nouvelles origines de réplcation (Zou *et al.*, 1998). Le dogme actuel propose donc une inhibition globale de la plupart des origines de réplcation par le checkpoint intra-S en réponse à un stress réplcatif. Ces constatations proviennent de l'observation en cellules de mammifères de l'activation d'origines de réplcations supplémentaires lorsque ATR est inhibé (Marheineke, 2004, Karnani *et al.*, 2011). Néanmoins, des données contradictoires sur l'activation d'origines dormantes en réponse au stress réplcatif ont été obtenues, reflétant les disparités de réponses entre les différents modèles utilisés et les types de stress réplcatifs appliqués (Woodward, 2006). Des travaux récents basés sur du BrdU-chIP (Immunoprécipitation de chromatine sur bromodeoxyuridine) en cellules de mammifères proposent une théorie unificatrice décrivant une régulation fine de l'activation des origines de réplcation (Karnani *et al.*, 2011) : en réponse à un stress réplcatif (hydroxyurée), la plupart des origines de réplcation tardives seraient inhibées, tandis que les origines dormantes proches des fourches de réplcation bloquées seraient activées.

Par ces multiples aspects, le checkpoint intra-S est capable d'une part de ralentir la phase S, et d'autre part de stabiliser les fourches de réplcation pour limiter leur effondrement.

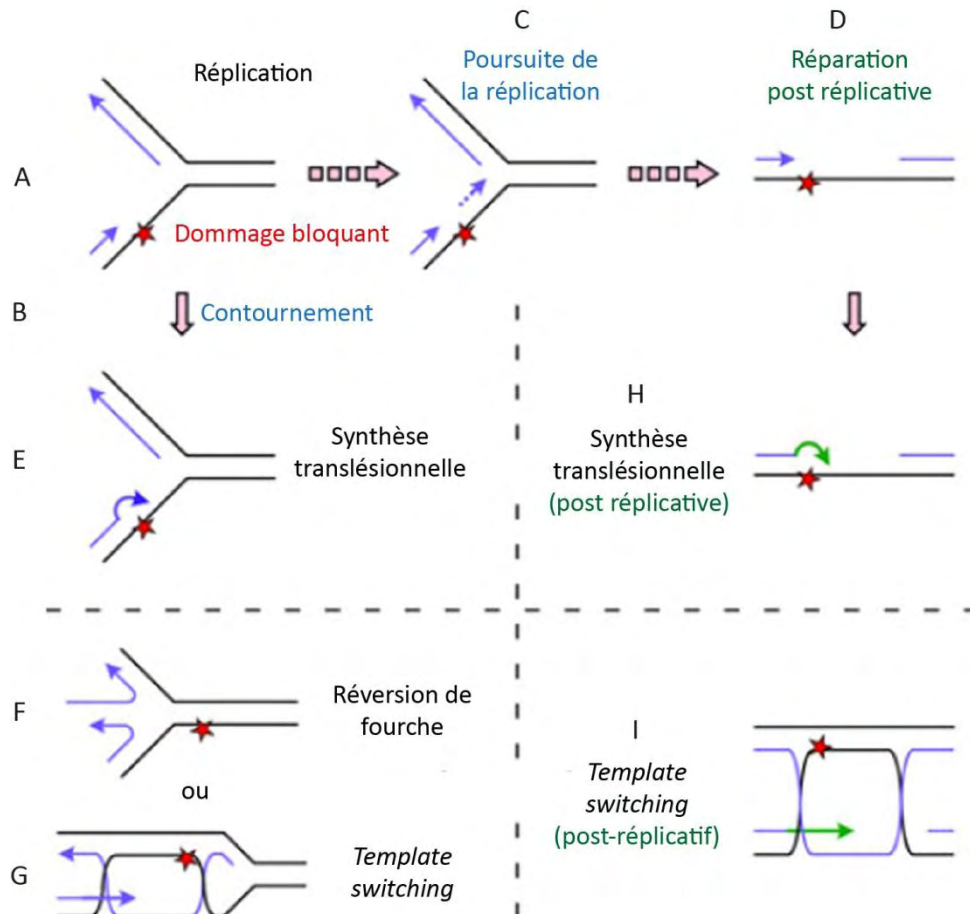


Figure 4. Réparation/Tolérance des dommages bloquant la réplication.

Un dommage encombrant (A) peut être contourné au niveau de la fourche de réplication par l'échange temporaire de polymérases répliquatives (B) avec des polymérases tolérantes aux dommages (E, synthèse translésionnelle) ou par l'utilisation du brin néosynthétisé du *lagging strand* comme matrice pour la synthèse du *leading strand* (F et G). L'extension est possible grâce à la réversion de fourche (F) ou grâce à la formation d'un intermédiaire de recombinaison par invasion de brin (*template switching*, G). Si une amorce s'hybride en aval du *leading strand* (C), la synthèse translésionnelle (H) et le *template switching* (I) peuvent survenir de manière post-réplivative au niveau de zones non répliquées. Adapté de Ulrich, 2011 .

e. Prise en charge des lésions bloquant la réplication

Les dommages encombrants sont généralement pris en charge par la réparation par excision de nucléotides (NER) (comme expliqué dans le chapitre I. 1) b.). Néanmoins, lorsque les hélicases répliquatives séparent les deux brins d'ADN matrice, ces dommages sont exposés dans l'ADN simple-brin. Or les polymérases répliquatives classiques sont incapables d'utiliser cet ADN endommagé comme matrice. Dans ce cas de figure, le BER et le NER sont dans l'incapacité de réparer ces dommages au sein de la fourche de réplication. En effet, les deux brins étant séparés, l'ADN simple-brin endommagé n'a plus de matrice pour permettre la resynthèse de la région excisée. De plus, un clivage de cet ADN simple-brin par le BER ou le NER conduirait instantanément à une conséquence plus sérieuse : l'effondrement de la fourche de réplication. Une lésion portant sur le *lagging strand* (synthétisé de manière discontinue, Figure 2) ne conduit pas forcément à un blocage de la fourche, mais provoque plutôt un *gap* dans le brin néosynthétisé, *i.e.* un fragment d'Okazaki incomplet. En revanche, les lésions sur le *leading strand* sont bien plus problématiques étant donné la synthèse d'ADN continue (Figure 4 A). La réplication du brin peut se poursuivre soit grâce au contournement de la lésion par la fourche de réplication (Figure 4 B), soit par l'hybridation d'un primer ADN après la lésion sur le *leading strand* (Figure 4 C). Dans ce dernier cas, la lésion persiste et crée un *gap* dans le brin néosynthétisé, comme pour le *lagging strand*, réparé après la réplication (Figure 4 D). Quel que soit le cas, deux voies de contournement peuvent être différenciées :

- une copie directe de l'ADN endommagé par des polymérases spécialisées et moins fidèles que les polymérases répliquatives : c'est la synthèse translésionnelle (*TransLesion Synthesis*, TLS, Lehmann *et al.*, 2007, Waters *et al.*, 2009 , Figure 4 E et H).

- une voie d'évitement du dommage qui n'utilise pas l'ADN endommagé comme matrice pour synthétiser de l'ADN (Heller *et al.*, 2006, McGlynn *et al.*, 2002) : le *template switching* (TS). Dans ce cas, le brin bloqué utilise le brin néosynthétisé homologue comme matrice pour la synthèse d'ADN à la place du brin endommagé (Figure 4 F, G et H).

Le choix entre ces deux voies de contournement semble se faire au niveau de PCNA, dont l'ubiquitylation contrôle l'activité de la TLS et du *template switching* (Hoegge *et al.*, 2002). En réponse à un stress répliatif, la protéine PCNA peut être monoubiquitylée et polyubiquitylée. Ces modifications ont été observées dans beaucoup d'espèces eucaryotes, et les enzymes impliquées semblent très conservées (Hoegge *et al.*, 2002). La monoubiquitylation de PCNA sur le résidu lysine 164 est médiée par RAD6, une *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2) en coordination avec RAD18, une *ubiquitin protein ligase* (E3), alors que la polyubiquitylation sur la Lysine 63 est catalysée par SHPRH (Frampton *et al.*, 2006) et HTLF (Motegi *et al.*, 2006). De manière intéressante, les deux modifications marquent PCNA pour des fonctions alternatives :

- la monoubiquitylation active la TLS par des polymérases tolérantes au dommage (Figure 4 E et H, Stelter *et al.*, 2003, Kannouche *et al.*, 2004). La plupart d'entre elles appartiennent à la famille des γ -polymérases, possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine et une affinité supérieure pour la forme monoubiquitylée de PCNA, favorisant ainsi leur recrutement au niveau de la lésion à contourner (Bienko *et al.*, 2005, Plosky *et al.*, 2006). Ces polymérases possèdent un site accepteur de nucléotides plus vaste que les polymérases répliatives, leur permettant d'accepter les brins d'ADN endommagés, ayant subi des distorsions importantes (pour revue, Sale *et al.*, 2012). Les polymérases translésionnelles insèrent des nucléotides (différents en fonction de la lésion et de la polymérase) en face de l'ADN endommagé et poursuivent la répliation de ce brin sur plusieurs nucléotides après la lésion pour combler le *gap* (Bridges *et al.*, 1985). Comme expliqué précédemment, les polymérases répliatives classiques possèdent une activité *proofreading* qui assure une bonne fidélité de répliation aux polymérases répliatives. En revanche, les polymérases translésionnelles étant dépourvues d'activité *proofreading*, leur répliation du brin post-lésion incorpore plus de nucléotides non-complémentaires, conduisant ainsi à de la mutagénèse sur le brin néosynthétisé (Sale *et al.*, 2012).

- la polyubiquitylation de PCNA active une voie alternative ne produisant pas d'erreur : le *template switching* (Figure 4 F, G et I). Ce mode de contournement est encore mal caractérisé, mais semble proche de la RH (développée dans le chapitre I. 4) b.) d'après des études menées essentiellement chez la levure. Il semble que le

template switching soit possible au niveau de la fourche bloquée (Figure 4 F et G), ou après contournement de la lésion (donc derrière la fourche) en réparation post-réplivative (Figure 4 I). Ces deux voies seraient médiées respectivement par RAD51 et RAD52, et par RAD18–RAD5–MMS2–UBC13 (pour revue, Branzei *et al.*, 2010). Dans les deux cas, le brin naissant, bloqué en 3' par la lésion, change de matrice (*Template switch*) : il s'hybride avec le brin naissant complémentaire de la chromatide sœur.

Plusieurs modèles sont suggérés pour le *template switching* (Broomfield *et al.*, 2001):

- le brin naissant bloqué pourrait envahir le duplex de la chromatide sœur de façon très similaire à la RH, pour former une jonction de Holliday (Figure 4 G et I). En migrant, la structure recouvre le dommage et permet ainsi de le contourner, alors que le brin naissant poursuit sa synthèse grâce au brin complémentaire de la chromatide sœur. La jonction peut ensuite être dissoute ou résolue pour permettre la poursuite de la réplication.

- dans l'autre modèle, sans invasion du duplex de la chromatide sœur, le brin naissant bloqué poursuit sa synthèse en s'hybridant avec le brin naissant complémentaire, qui est plus long car il n'a pas été bloqué (Figure 4 F). Ce phénomène est appelé « réversion de fourche ». Une fois la synthèse parvenue au bout de la matrice, il y a séparation des deux brins par résolution et le brin anciennement bloqué s'hybride à nouveau avec son ancienne matrice, couvrant la lésion. Sa synthèse peut alors continuer normalement.

Enfin, une modification post-traductionnelle de PCNA, préalablement observée chez la levure, a également été décrite chez l'homme. Il s'agit de la sumoylation sur la lysine 164, (Moldovan *et al.*, 2012). Elle permettrait le recrutement de PARI (*PCNA-associated recombination inhibitor*) au niveau des fourches de réplication bloquées. PARI est l'homologue humain de l'antirecombinase de levure Srs2. Le rôle et le mécanisme de cette interaction sont sujets à débat. Selon le modèle actuel, PARI

inhiberait les événements de RH inappropriés au niveau de la fourche de réplication bloquée, mais également, favoriserait l'utilisation de la TLS (Gali *et al.*, 2012).

3) Les cassures double-brin de l'ADN

Parmi tous les types de dommages énoncés précédemment, un grand nombre peut dégénérer en cassures double-brin (CDB) ; or les CDB de l'ADN font partie des lésions les plus cytotoxiques. En effet, on considère qu'une seule CDB non réparée suffit à conduire à la mort de la cellule (Huang *et al.*, 1996, Bennett *et al.*, 1993). Par ailleurs, les CDB peuvent non seulement conduire à des mutations locales, comme des additions/délétions de bases, mais également à des pertes massives d'informations génétiques, par exemple des millions de paires de bases dans le cas d'une perte d'un chromosome (ou d'un fragment de chromosome), ou encore à des réarrangements majeurs dans le cas de translocations chromosomiques.

a. Origines des cassures double-brin:

➤ Les espèces réactives de l'oxygène.

Pendant la respiration, la mitochondrie convertit environ 0,1 à 1% de l'oxygène en superoxide ($O_2^{\cdot-}$) (Chance *et al.*, 1979) ; les superoxides dismutases de la mitochondrie (SOD2) ou du cytosol (SOD1) convertissent l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène puis dans une seconde étape en radicaux libres hydroxyle ($\cdot OH$), pouvant réagir avec l'ADN pour causer des CSB. Il n'est pas clairement établi qu'un radical libre puisse directement causer une CDB, mais deux lésions proches sur des brins antiparallèles peuvent causer une CDB (Freifelder *et al.*, 1969). Or, environ 10^{22} radicaux libres sont produits dans le corps humain chaque heure, ce qui représente une source non négligeable de dommages à l'ADN. Les stress oxydatifs subits par les cellules sont également causés par de nombreux agents exogènes, tels la pollution, la

fumée de cigarette, les contaminants alimentaires, environnementaux ou certains agents génotoxiques...

➤ *La réplication de l'ADN*

Comme expliqué dans le chapitre I. 2), de nombreuses fourches de réplifications répliquent simultanément l'ADN en phase S et peuvent être stoppées par divers dommages. Ces blocages peuvent alors conduire à leur effondrement et à l'apparition de CDB (Lundin *et al.*, 2002, Saintigny *et al.*, 2001). Ainsi, en condition de stress réplcatif, la phase S constitue une source majeure de CDB.

➤ *Les enzymes du métabolisme de l'ADN*

Les CDB peuvent également être causées par l'action inappropriée d'enzymes du métabolisme de l'ADN. Cela inclut les topoisomérases de type I et II, qui dans des conditions normales, clivent temporairement l'ADN et religuent les extrémités (comme expliqué dans le chapitre I. 2) b.) : la topoisomérase II clive les deux brins du duplex d'ADN, tandis que la topoisomérase I n'en clive qu'un seul. Des inhibiteurs de l'activité des topoisomérases sont utilisés en thérapies anticancéreuses pour produire des cassures de l'ADN. En effet, ces inhibiteurs empêchent les topoisomérases de rejoindre les extrémités d'ADN, ce qui résulte en des CDB (Deweese *et al.*, 2009) directes (dans le cas de l'etoposide, inhibiteur de topo II) ou indirectes, suite au passage de la fourche de réplication (dans le cas de la camptothécine, inhibiteur de topo I) (Pommier, 2006). Ces inhibiteurs sont donc particulièrement efficaces pour provoquer des CDB toxiques dans les cellules prolifératives, comme les cellules cancéreuses.

D'autres enzymes nucléaires peuvent provoquer des CDB, comme les enzymes impliquées dans deux étapes de la maturation du système immunitaire : la recombinaison V(D)J et la commutation isotypique. Lors de ces étapes, des enzymes provoquent des CDB sites-spécifiques, qui conduisent à des réarrangements contrôlés des gènes codant pour les immunoglobulines : RAG1 et RAG2 (*Recombination Activating Gene*) pour la recombinaison V(D)J, AID (*Activation-Induced Deaminase*)

pour la commutation isotypique (Soulas-Sprauel *et al.*, 2007b). Ces réarrangements sont nécessaires pour former des immunoglobulines fonctionnelles (recombinaison V(D)J) ou modifier les propriétés d'anticorps préexistants (commutation isotypique). Néanmoins, il arrive parfois que ces réarrangements soient inexacts et favorisent le développement tumoral : on estime que 50% des lymphomes humains sont dus à des translocations initiées par ces CDB programmées (ce point sera discuté plus loin, chapitre I. 3) 4).).

Enfin, les cellules méiotiques subissent une forme supplémentaire de CDB, qui sont physiologiques et causées par l'enzyme SPO11 (Zickler *et al.*, 1999). SPO11 crée des CDB pour permettre la formation de crossing-overs entre chromosomes homologues pendant la prophase méiotique I, indispensables à leur ségrégation et à l'origine du brassage génétique.

➤ *Les radiations ionisantes*

Une autre origine des CDB est liée aux radiations ionisantes naturelles de l'environnement et les rayonnements utilisés en diagnostic ou en thérapeutique comme les radiations gamma et les rayons-X. Au niveau de la mer, chaque personne est frappée par environ 300 millions de particules de radiation ionisantes par heure. Lorsqu'elles traversent le corps, elles créent des radicaux libres principalement à partir des molécules d'eau situées sur leur trajectoire, conduisant à un stress oxydatif dans les cellules exposées. Lorsqu'une particule passe près d'un duplex ADN, des groupes de radicaux libres sont créés et causent des cassures simple- et double-brin, selon un ratio d'environ 25:1. Environ la moitié des radiations ionisantes qui nous frappent proviennent de l'espace et sont le vestige de la création de l'univers : le *Big Bang*. Beaucoup plus de radiations rejoindraient la surface de la Terre sans l'atmosphère, la plupart des particules étant stoppées par l'atmosphère supérieure et le champ magnétique terrestre (Benton *et al.*, 2001). L'autre moitié de ces radiations provient de la décroissance des éléments radioactifs (principalement des métaux) de la Terre. Des substances, appelées radiomimétiques, provoquent des dommages similaires à ceux des radiations ionisantes (calichéamicine Y1, bleomycine, neocarzinostatine...).

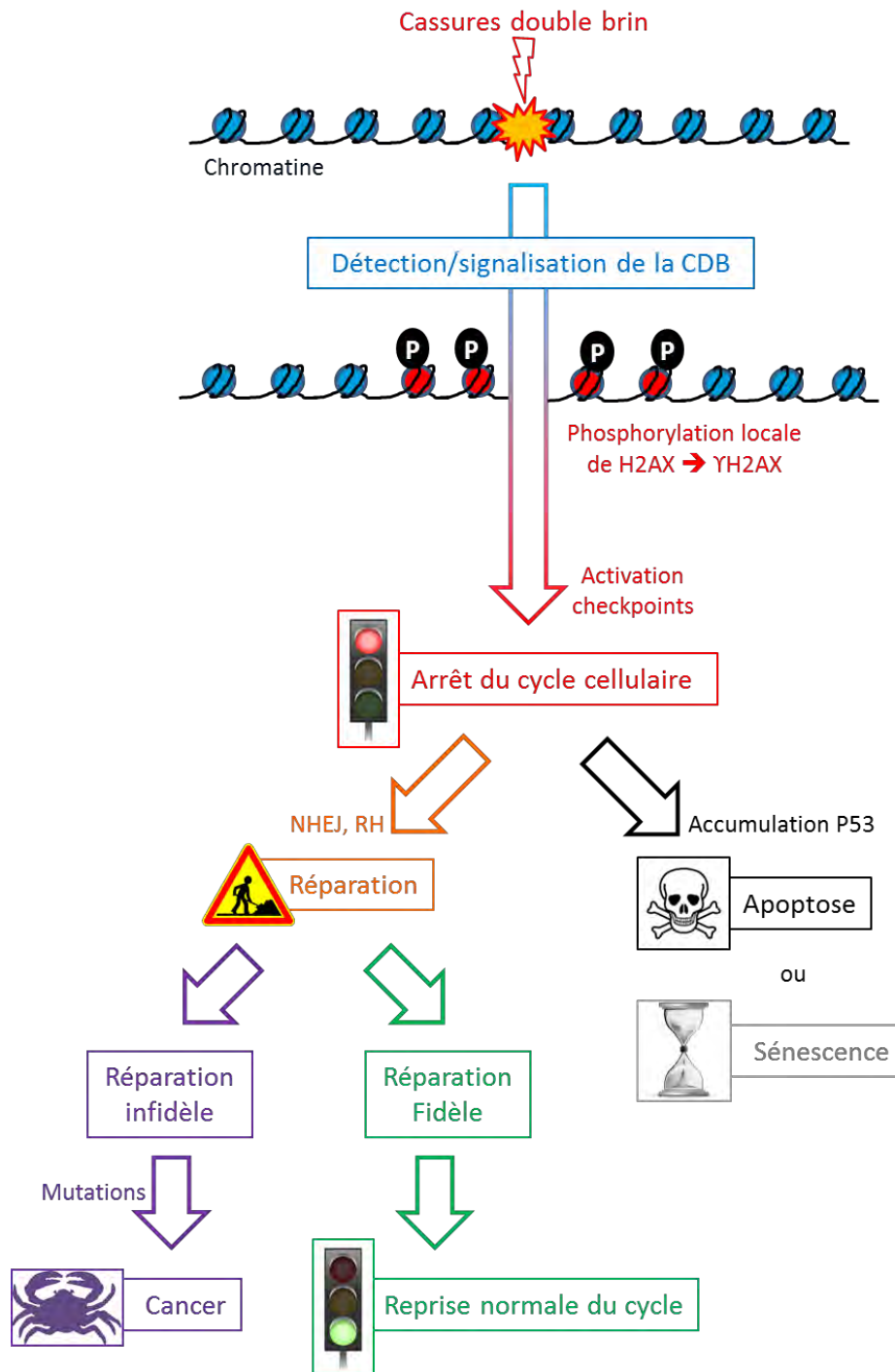


Figure 5. Schéma de la réponse aux cassures double-brin.

La formation de CDB est détectée par des protéines senseurs, capables de se lier aux CDB. Elles favorisent des cascades de modifications post-traductionnelles au niveau du site de la CDB (phosphorylations, ubiquitinations, sumoylations...), dont la phosphorylation du variant d'histone H2AX sur plusieurs mégabases autour du site de cassure. Ces cascades de modifications conduisent à l'activation de checkpoints de dommages à l'ADN et à l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt est nécessaire pour permettre la réparation de la CDB, essentiellement par recombinaison homologue (RH) ou jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ). Une réparation fidèle permet la levée des checkpoints et le redémarrage dans le cycle sans mutations. En revanche, une réparation infidèle peut induire des mutations, vectrices de cancers si la cellule poursuit sa prolifération. Si ces dommages sont trop nombreux ou irréparables, l'accumulation du facteur pro-apoptotique p53 peut conduire à l'apoptose, une autodestruction de la cellule, ou la sénescence, un arrêt définitif du cycle de la cellule.

➤ Les génotoxines

Enfin, certains microorganismes de notre environnement et même de notre microbiote peuvent être source de CDB. Par exemple, la calichéamicine Y1 est un radiomimétique produit par la bactérie *Micromonospora echinospora*. Cette toxine est capable d'induire directement le clivage des deux brins d'ADN et a été utilisée en thérapie anticancéreuse (Elmroth, 2003, Ellestad, 2011). Des CDB ont également été observées dans les cellules humaines en réponse à des toxines bactériennes, comme la colibactine (Nougayrede *et al.*, 2006) ou la *Cytolethal Distending Toxin* (CDT) (Elwell *et al.*, 2000) produites par des souches bactériennes commensales et/ou pathogènes. Cependant le mécanisme d'apparition de ces CDB est imparfaitement caractérisé (les génotoxines bactériennes sont développées dans le chapitre III. 1) b.).

En conséquence de toutes ces sources de CDB, on estime qu'en moyenne, chaque cellule de notre corps subit spontanément une dizaine de CDB quotidiennement en temps normal (Martin *et al.*, 1985, Lieber *et al.*, 2004, Lieber *et al.*, 2003). Ainsi les systèmes de réponse aux CDB, permettent d'une part de détecter et signaler ces dommages, et d'autre part d'activer des points de contrôles (« *checkpoints* ») stoppant la progression du cycle cellulaire avant la phase S (G1/S), avant la mitose (G2/M), et ralentissant la réplication (intra-S). Ces checkpoints stimulent les systèmes de réparation et leurs donnent le temps de réparer les lésions. Le checkpoint G1/S vérifie l'intégrité de l'ADN avant d'entamer la réplication. En effet, il est crucial de posséder un ADN intègre pour une réplication fidèle en phase S. Le checkpoint intra-S contrôle la réplication, tandis que le checkpoint G2/M vérifie l'intégrité du génome, étape essentielle pour une mitose sans anomalie. L'arrêt du cycle est donc essentiel afin que la cellule puisse survivre aux CDB.

b. Voies de réponses cellulaires aux cassures double-brin

Face aux CDB, la cellule réagit en activant des voies de réponses cellulaires aux CDB. Ces voies impliquent la détection et la signalisation des CDB, et permettent

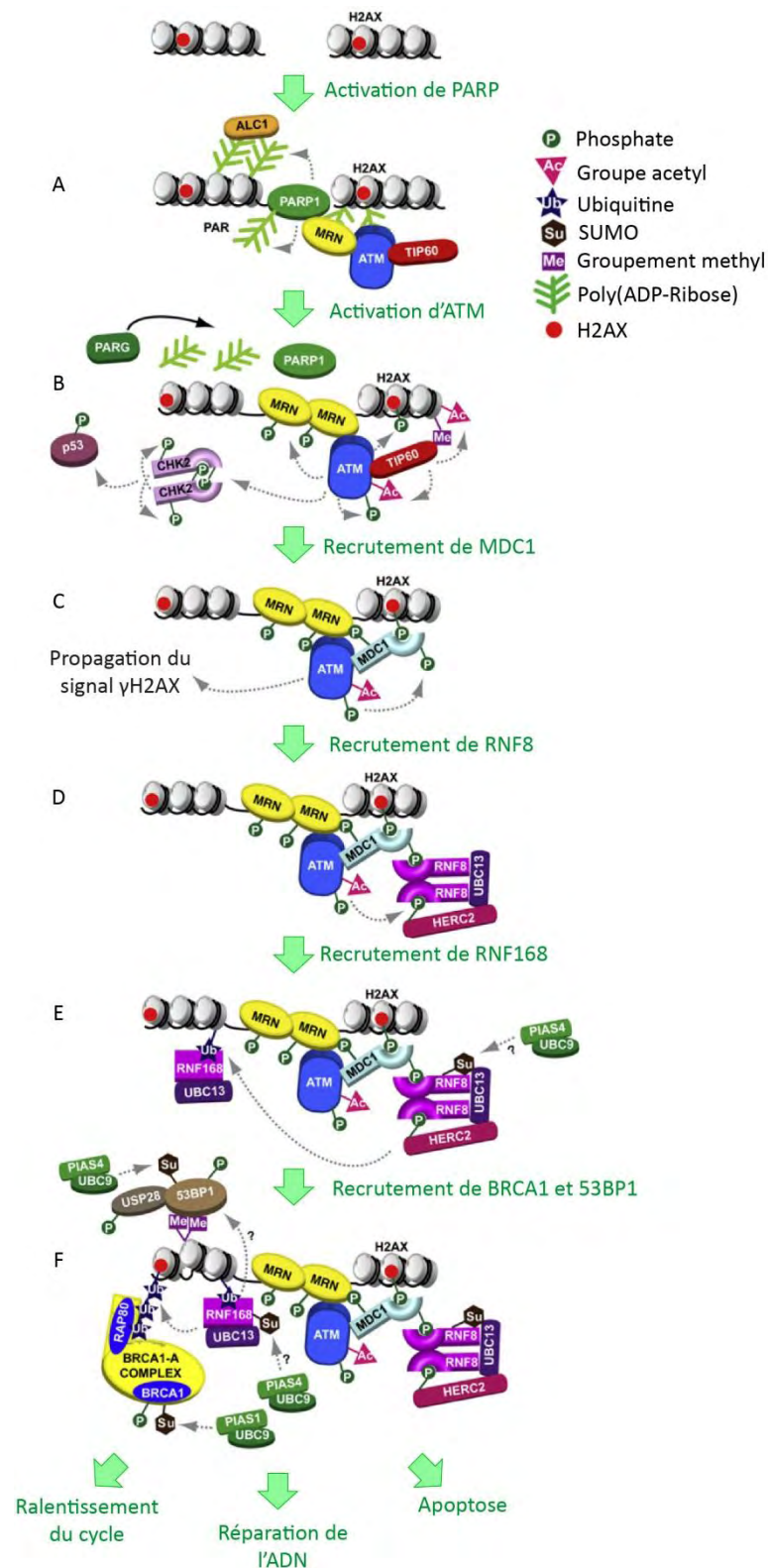


Figure 6. La voie de réponse aux cassures double-brin de l'ADN.

La formation de CDB active PARP1 (A), qui favorise le recrutement de MRN/ATM aux CDB. L'activation de l'activité kinase d'ATM par MRN conduit à la phosphorylation de CHK2 et p53 (B) en plus de plusieurs facteurs de la DDR. L'induction de la cascade dépendante de γ H2AX conduit au recrutement de MDC1, RNF8, RNF168, BRCA1 et 53BP1 (C) aux CDB. La transduction du signal est assurée par d'autres modifications post-traductionnelles autour de la CDB (D,E,F), comme décrit en détail dans le texte. Adapté de Ciccia *et al.*, 2010 .

l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Une fois activé, ils stoppent la progression du cycle et fournissent le temps nécessaire à la cellule pour réparer les lésions. Si ces dommages sont trop nombreux ou impossibles à réparer, les cellules peuvent s'autodétruire par apoptose ou stopper définitivement leur prolifération en devenant sénescences (Figure 5).

➤ *Détection de la cassure double-brin*

La communauté scientifique s'accorde sur le fait que lorsqu'une CDB survient, elle est détectée par des protéines « senseurs » du dommage. Toutefois, les avis divergent quant à l'ordre d'arrivée des protéines au niveau de la CDB. Selon l'un des modèles proposés, les tous premiers senseurs de cette cassure seraient les protéines PARP1 et 2 (*Poly-ADP Ribose Polymerase 1 et 2*), qui, grâce à leurs motifs en doigt de zinc, sont capables de fixer les cassures de l'ADN (CSB et CDB) et catalysent localement l'addition de chaînes Poly-ADP-Ribose (PAR) sur des protéines cibles, incluant les histones H1, H2B et PARP1 elle-même (Figure 6 A, Schreiber et al., 2006). La PARylation des histones contribuerait à la réorganisation chromatinienne et initierait le recrutement du complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) (Haince et al., 2008) qui médie le recrutement et l'activation d'ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*) (Uziel et al., 2003, Lee et al., 2005, Falck et al., 2005), une Phosphoinositide 3-kinase de classe IV cruciale pour la cascade de signalisation de la CDB (Figure 6 A). En effet, l'inhibition de PARP conduit à un défaut d'activation d'ATM et donc de la voie de réponse aux CDB (Haince et al., 2007). En réponse aux CDB, les dimères d'ATM inactifs s'autophosphorylent et se séparent pour devenir des monomères actifs (Bakkenist et al., 2003). Par ailleurs, des mutations d'ATM causent l'Ataxia-Telangectasia (A-T) chez l'Homme, pathologie caractérisée par une dégénérescence cérébrale, une immunodéficience, une instabilité génomique, une radio-sensibilité et une prédisposition au cancer (Savitsky et al., 1995). Néanmoins, d'autres modèles suggèrent que le recrutement de MRN se ferait grâce aux domaines de liaison à l'ADN de RAD50 (domaines *Walker A* et *Walker B*), sans l'intervention de PARP1 et 2 (Williams et al., 2007). Comme pour beaucoup de protéines dans la voie de réponse aux CDB, la déficience du complexe MRN peut conduire à des syndromes : par exemple, un syndrome similaire à l'Ataxia-

Telangectasia pour une mutation hypomorphe de MRE11 ou encore le *Nijmegen Breakage Syndrome* dans le cas d'une déficience en NBS1, caractérisé notamment par un défaut du système immunitaire et une susceptibilité à développer des cancers.

➤ *Signalisation de la cassure double-brin*

Afin de provoquer une réponse cellulaire face à cette CDB, les protéines recrutées au site de cassure provoquent une cascade de signalisation : stimulée par MRN, ATM phosphoryle plus de 700 substrats (Matsuoka *et al.*, 2007), dont plusieurs au niveau du site de cassure, comme H2AX, un variant de l'histone H2A (Figure 6 B). Ce variant représente environ 15-20% de la totalité de H2A et serait donc présent dans environ un nucléosome sur cinq (Bonner *et al.*, 2008). H2AX diffère principalement de H2A par son extrémité C-terminale plus longue et qui est phosphorylée sur la serine 139 dans les nucléosomes proches de la CDB : elle est alors appelée γ H2AX (Rogakou *et al.*, 1998). Cette modification post-traductionnelle est importante pour la réponse aux dommages à l'ADN, puisque les souris *H2AFX* (le gène codant pour H2AX) Knock-Out présentent des défauts de recrutement d'autres facteurs de la voie de réponse aux CDB, une instabilité génomique par translocations chromosomiques, plus de tumeurs, une sensibilité aux radiations ionisantes et une immunodéficiences (Celeste *et al.*, 2003, Celeste, 2002, Bassing *et al.*, 2003). Il n'existe aucune mutation dans *H2AFX* connue chez l'homme, et peu de mutations caractérisées dans des cancers. En revanche, le nombre de copies de ce gène est altéré dans de nombreux cancers, dont environ 37% des cancers du sein (Srivastava *et al.*, 2008).

Grâce à son domaine BRCT (*BRCA1 C-Terminus*), la protéine MDC1 (*Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1*) lie γ H2AX et agit comme une protéine « plateforme » au niveau du dommage (Harper *et al.*, 2007) (Figure 6 C). MDC1 interagit avec NBS1 et ATM *via* son domaine FHA (*Forkhead-Associated*) pour stimuler la phosphorylation de γ H2AX ATM-dépendante, qui, à son tour augmente le recrutement de MDC1, stimulant encore ATM, etc (Figure 6 C)... Cette boucle de régulation positive conduit à la phosphorylation de γ H2AX dans les nucléosomes sur

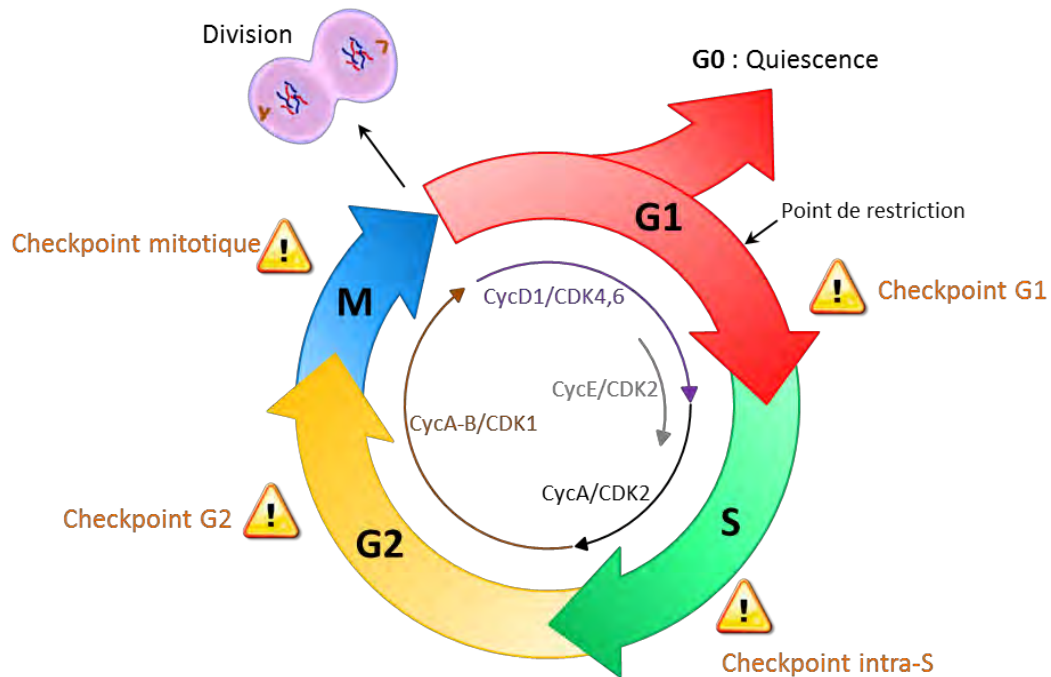


Figure 7. Le cycle cellulaire et ses points de contrôle.

Le cycle cellulaire est stimulé par différents couples de cyclines/CDK, variant au cours des phases du cycle, et régulé par différents points de contrôles (checkpoints). L'activation d'un de ces checkpoints conduit à l'arrêt du cycle dans la phase correspondante. Le checkpoint G1 empêche ainsi le passage en phase S si l'ADN est endommagé. Le checkpoint intra-S ralentit la progression de la phase S et stabilise les fourches de réplication en cas de dommages à l'ADN pouvant perturber la réplication. Le checkpoint G2 bloque tout passage en mitose si l'ADN présente des CDB. Enfin le checkpoint intra-M contrôle l'assemblage correct du fuseau mitotique, pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes.

plusieurs mégabases autour du site de dommage, formant un « foyer γ H2AX », observable en immunofluorescence anti- γ H2AX (Lou et al., 2006). Cette amplification locale de l'activité d'ATM et du signal γ H2AX est nécessaire pour maintenir une réponse cellulaire continue aux CDB, et conserver les facteurs impliqués dans cette réponse au niveau de la lésion (Celeste, 2002).

➤ *Les points de contrôle en réponse aux cassures double-brin*

Un des buts de la signalisation cellulaire de la CDB est d'activer les points de contrôle (ou checkpoints) des phases G1/S ou G2/M du cycle cellulaire (Figure 7). Pour cela, ATM phosphoryle la protéine effectrice CHK2 (*Checkpoint Kinase 2*), un régulateur majeur du cycle cellulaire (Figure 6 B). CHK2 phosphoryle les phosphatases du cycle CDC25-A et CDC25-C, inactives sous leur forme phosphorylée (Reinhardt *et al.*, 2009). Leur activité phosphatase consiste majoritairement à activer par déphosphorylation les complexes Cycline-E/CDK2, Cycline-A/CDK2 et Cycline-B/CDK1 (Figure 7), kinases qui ciblent le complexe pRB/E2F et conduisent à sa dissociation. E2F joue alors son rôle de facteur de transcription et stimule l'expression de nombreux gènes, en particulier ceux impliqués dans l'initiation et la progression de la phase S. Par conséquent, l'inactivation des CDC25 par CHK2 conduit à la répression de toute cette voie et empêche la progression dans les différentes phases du cycle (respectivement G1, S et G2 pour les différents complexes CDK/cyclines cités, Figure 7). Par ailleurs, l'accumulation de CDK2 inactif, ne pouvant phosphoryler CDC45, empêche l'initiation de la réplication.

Grâce à leurs activités kinases, ATM et CHK2 phosphorylent également le facteur de transcription p53 sur différents résidus (Kastan *et al.*, 2000), induisant la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'activation des checkpoints G1/S et G2/M, ou des inhibiteurs du cycle tel p21. Ainsi, la protéine p21 inhibe le complexe cycline E/CDK2 et renforce ainsi le blocage du cycle.

➤ *Sénescence et apoptose induites par les cassures double-brin*

La persistance de CDB non réparées représente un danger pour des cellules prolifératives. En effet, si les checkpoints et/ou les systèmes de réparation sont déficients, les CDB persistent jusqu'en mitose. Pour une cellule, entrer en mitose avec des CDB conduit à laisser des fragments chromosomiques libres, sans centromères. Puisque le centromère est nécessaire à la fonction du kinétochore et à la ségrégation des chromatides, ces fragments ne sont pas captés par les microtubules du fuseau mitotique. Cette situation peut mener à des catastrophes mitotiques ou à la production de cellules filles aneuploïdes (avec un nombre anormal de chromosomes). En addition des checkpoints, la cellule possède des processus pour éliminer ou neutraliser les cellules dont les CDB ne sont pas réparées : la sénescence, un arrêt du cycle cellulaire irréversible dû à l'activation permanente des checkpoints (Di Leonardo *et al.*, 1994), ou encore l'apoptose, mort cellulaire programmée.

En plus d'activer les checkpoints de dommages à l'ADN, p53 induit aussi l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que PUMA (*p53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis*) et BAX (*Bcl-2-Associated X protein*) (Riley *et al.*, 2008) et antagonise directement les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL, BAX étant alors transloquée à la mitochondrie. L'activation de la voie apoptotique persiste tant que les CDB ne sont pas réparées et, passé un certain délai ou si le nombre de CDB est très élevé, la quantité de p53 accumulée dépasse le seuil suffisant pour déclencher l'apoptose (Roos *et al.*, 2006). Dans ce cas, les protéines BAX transloquées à la mitochondrie provoquent la libération de cytochrome C, qui va lui-même se lier à APAF-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) et conduire à l'activation de la caspase 9, puis de la caspase 3. Cette dernière induit notamment la libération de DFF40 (*DNA Fragmentation Factor, 40-kd subunit*), une endonucléase chargée de fragmenter la chromatine pendant l'apoptose (Roos *et al.*, 2006). L'apoptose se conclut par l'autodestruction de la cellule et évite ainsi la persistance de cellules avec des dommages non réparés, ce qui pourrait représenter une menace pour l'organisme.

Contrairement à la quiescence (Figure 7), la sénescence ne peut pas être réversée en altérant l'environnement cellulaire, en supprimant l'inhibition de contact ou en ajoutant des nutriments *in vitro*. Les cellules sénescents sont caractérisées par

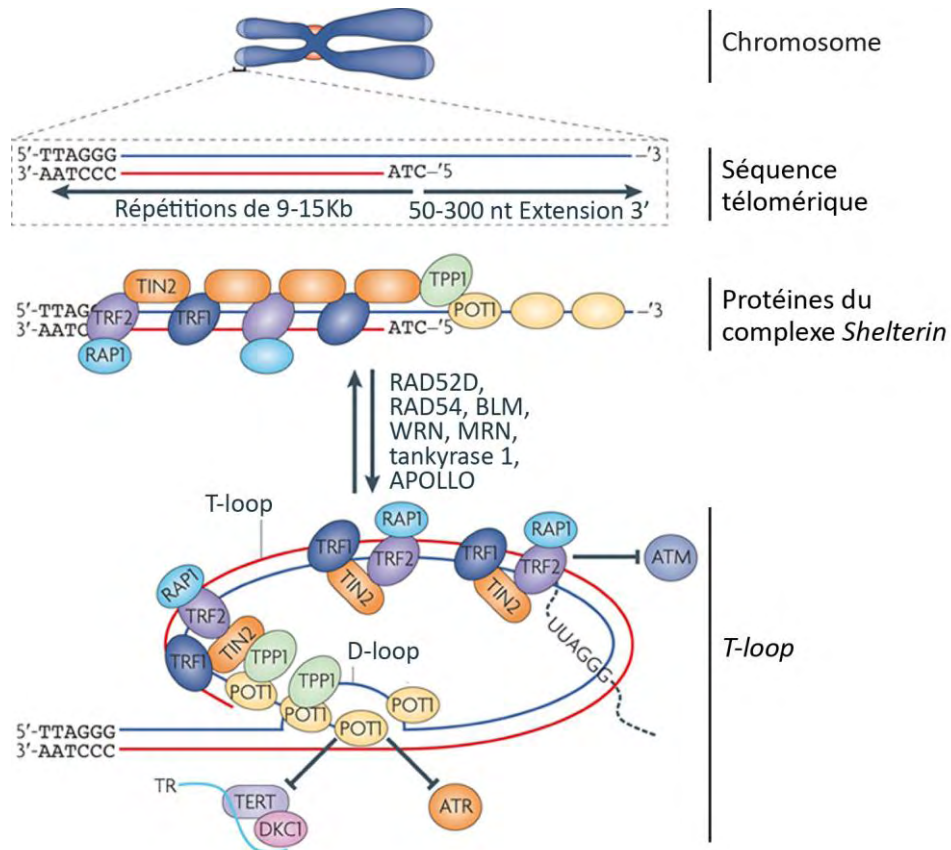


Figure 8. Le télomère et le complexe *Shelterin*.

Les extrémités des chromosomes sont constituées de répétitions TTAGGG de 9-15 Kb et de 50 à 300 nt d'extension 3'. Les protéines telles que TRF1, TRF2 et POT1 sont capables de lier spécifiquement ces séquences et sont essentielles au recrutement des autres protéines du complexe *shelterin* (TIN2, TPP1, RAP1). La formation du complexe *shelterin* nécessite l'invasion de l'extrémité 3' dans les séquences télomériques pour former une *T-loop*. Le complexe *shelterin* inhibe la signalisation et la réparation de l'extrémité télomérique en inhibant notamment ATM et ATR. L'absence ou la déficience du complexe *shelterin* conduit à la dérégulation des voies de réponses aux CDB et à des fusions télomériques.

une activation constitutive des voies de réponses aux CDB et notamment par des foyers persistants (*senescence-associated DNA-damage foci*). La sénescence peut se produire spontanément, en l'absence de sources de dommages exogènes, lorsque les télomères sont trop courts. Les télomères sont les extrémités double-brin naturelles des chromosomes : pourtant, ces extrémités n'activent pas spontanément la réponse aux CDB. En effet, les télomères sont composés de séquences répétées TTAGGG de 3 à 20 kilobases, associées au complexe *shelterin* (Figure 8). Ce complexe empêche le télomère d'être reconnu comme une CDB, notamment grâce aux protéines TRF2 et POT1 qui inhibent respectivement ATM et ATR (Denchi *et al.*, 2007) et à la répression des systèmes de réparation au niveau du télomère (Figure 8, Chan *et al.*, 2003). Les télomères étant imparfaitement répliqués pendant la phase S, ils raccourcissent au fur et à mesure des divisions dans les cellules saines, limitant ainsi leur prolifération. Si les télomères sont trop courts ou si la formation du complexe *shelterin* est altérée, l'extrémité ADN active la réponse aux CDB, comme le montre la persistance de foyers γ H2AX et l'association de protéines de la réponse aux CDB au niveau de télomères raccourcis (Takai *et al.*, 2003). A la manière d'une CDB non réparée, le télomère active alors les checkpoints et est à l'origine de la sénescence dite « répllicative ». Si le choix de l'activation de la sénescence plutôt que l'apoptose en réponse aux CDB reste mystérieux, de nouvelles données soulignent l'importance de la localisation de ces CDB. En effet, la sénescence induite par irradiation dans des cellules humaines saines pourrait être liée à des CDB proches des régions télomériques et non réparées à cause de l'inhibition de la réparation par les protéines du complexe *shelterin* (Fumagalli *et al.*, 2012).

Ce qui détermine le choix entre sénescence et apoptose est encore mal connu, probablement parce que la décision semble multifactorielle : le type cellulaire, l'intensité, la localisation, la durée et la nature des dommages semblent importants. En effet, une étude récente a démontré que les niveaux de p53 ne varient pas de la même façon dans les cellules humaines exposées aux irradiations ionisantes ou aux UV (Purvis *et al.*, 2012). Dans leur modèle, les UV (8 J/m^2) produisent une réponse p53 soutenue et constante menant majoritairement vers l'apoptose, alors qu'une exposition aux rayons gamma (10 Gy), provoquant une réponse p53 d'une intensité

proche à celle des UV, induit une activation de p53 en « dents de scie ». En effet, les niveaux de p53 sont augmentés après irradiation gamma, mais varient, avec des pics réguliers, et cette réponse mène essentiellement à la sénescence. Ces données montrent une hétérogénéité de réponse p53, et donc des destins cellulaires différents en fonction des dommages subis. Curieusement, en l'absence de dommages, l'expression ectopique de p53 de façon à mimer les niveaux de p53 réponse aux UV, conduit à la sénescence et non pas à l'apoptose. Ce résultat montre que les niveaux d'expression de p53 seuls ne déterminent pas le destin de la cellule, et que d'autres facteurs sont impliqués.

➤ *Autres modifications post-traductionnelles liées aux cassures double-brin*

En plus des cascades de phosphorylations menant à l'activation du checkpoint, l'environnement proche de la CDB est la cible de plusieurs autres modifications post-traductionnelles, favorisant la réparation du dommage. En effet, en plus de son rôle dans la formation des foyers γ H2AX, MDC1 initie une cascade d'ubiquitylations en s'associant à l'E3 ubiquitine-ligase RNF8 (*Ring Finger protein 8*) (Figure 6 D) (Huen *et al.*, 2007, Kolas *et al.*, 2007, Mailand *et al.*, 2007), qui mono-ubiquitine plusieurs cibles locales, dont H2A et H2AX (Figure 6 E et Mailand *et al.*, 2007) et potentiellement des protéines non-histones (Mattioli *et al.*, 2012). Grâce à RNF8, d'autres E3 ubiquitine-ligases, telles que RNF168 ou RNF4 (Galanty *et al.*, 2012), sont recrutées aux sites ubiquitylés grâce à leurs domaines MIU (*Motifs Interacting with Ubiquitin*) pour catalyser l'ajout sur H2A et H2AX de chaînes de polyubiquitines liées par leur Lysine 63 (K63) (Mattioli *et al.*, 2012). Enfin HERC2, également une E3 ubiquitine ligase, interagit avec le domaine FHA de RNF8 pour faciliter l'assemblage d'un complexe RNF8/UBC13 qui améliore encore la réaction de K63-polyubiquitylation (Bekker-Jensen *et al.*, 2009) (Figure 6 F). Ces chaînes d'ubiquitines localisées autour de la CDB sont cruciales pour le recrutement d'autres protéines de la voie de réponse au CDB, comme le complexe BRCA1-A (*BReast CAncer n°1*, Figure 6 F). En effet, plusieurs sous-unités du complexe BRCA1-A -telles que ABRA1 (*Actin-Binding Rho-Activating protein*), BRE (*Brain and Reproductive organ-Expressed protein*), BRCC36 (*BRCA1-Containing Complex subunit 36*), NBA1 (*New component of the BRCA1-A complex*), et RAP80 (*Receptor-Associated*

Protein 80)- possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine (Wang et al., 2009) et sont ainsi recrutées à la cassure. La polyubiquitylation n'est pas la seule modification post-traductionnelle influençant BRCA1-A, puisque son recrutement dépend également de la sumoylation par le complexe de SUMO-ligases PIAS1 et PIAS4 (Galanty et al., 2009, Morris et al., 2009). De plus, PIAS1 et PIAS4 pourraient également réguler l'activité ubiquitine-ligase de RNF8 et de RNF4 (Galanty et al., 2012). BRCA-1 est un suppresseur de tumeur qui revêt une importance cruciale dans la réparation des CDB par RH (point développé chapitre I. 4) b.) et est régulièrement retrouvé muté dans les cancers du sein et de l'ovaire (Miki et al., 1994).

➤ *Remodelage de la chromatine proche de la cassure double-brin*

Cette vague de modifications post-traductionnelles locales (PARylations, phosphorylations, ubiquitylations, sumoylations) ainsi que le recrutement par γ H2AX de protéines remodelant la chromatine, telles que INO80 et SWI/SNF, conduisent à une décompaction locale de la chromatine (Lee et al., 2010, van Attikum et al., 2009 pour revue). Cette ouverture de la chromatine serait nécessaire pour l'intervention des protéines des systèmes de réparation, mais aussi pour les autres facteurs de la voie de signalisation des CDB. En effet, la relaxation de la chromatine expose les lysines méthylées de l'histone H3 et H4 (H4K20 et H3K79), permettant la liaison de 53BP1 (*p53 Binding Protein 1*) par ses domaines TUDOR (FitzGerald et al., 2009) (Figure 6 F). 53BP1 jouerait alors un rôle protecteur en limitant la résection des extrémités ADN (Bunting et al., 2010) et en favorisant la religation des extrémités d'ADN par jonction d'extrémités non-homologues (Iwabuchi et al., 2003) (ce point est développé chapitre I. 4) c.).

4) Réparation des cassures double-brin

a. La jonction d'extrémités non-homologues

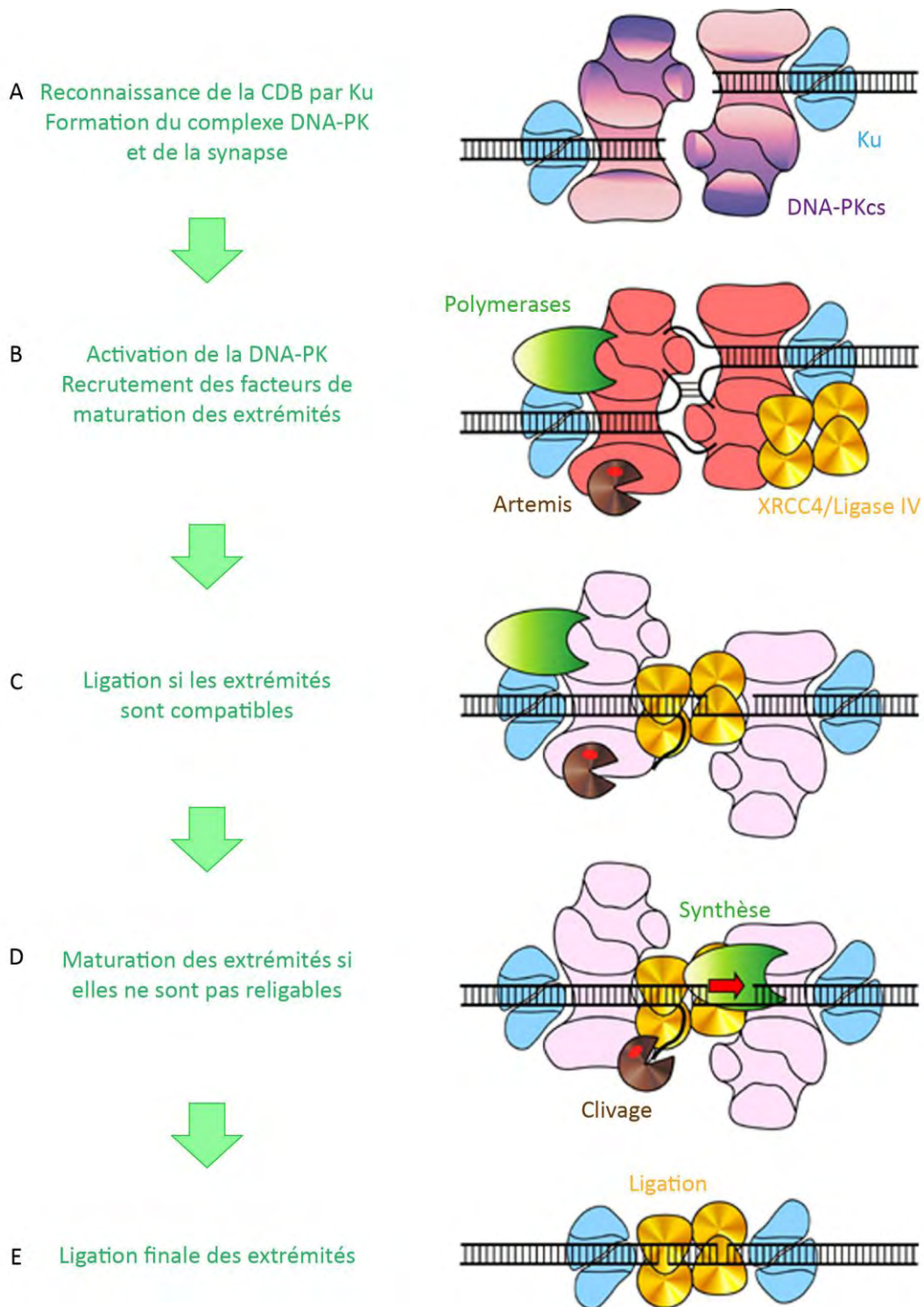


Figure 9. Modèle de réparation des CDB par C-NHEJ.

A. Ku lie les extrémités ADN et recrute DNA-PKcs (pour former DNA-PK), qui favorise la synapse des extrémités. B. XRCC4/Ligase IV/XLF, polymérase μ , et probablement d'autres nucléases s'assemblent au complexe synaptique. DNA-PK phosphoryle Artemis et active son activité endonucléase. DNA-PKcs s'autophosphoryle et s'éloigne des extrémités. Ceci favoriserait l'accès de XRCC4/Ligase IV/XLF. C. Si les extrémités sont compatibles, la ligation s'effectue immédiatement. D. Si les extrémités sont non-compatibles, XRCC4/Ligase IV/XLF restent sur le complexe synaptique pendant que les activités polymérase et nucléases maturent les extrémités. E. Dès que les extrémités sont maturées en un substrat compatible, XRCC4/Ligase IV/XLF termine la réaction de jonction. Adapté de Budman *et al.*, 2005 .

La réparation des CDB dans les cellules d'eucaryotes supérieurs se fait majoritairement par la jonction d'extrémités non-homologues (*Non-Homologous End-Joining*, NHEJ) ; elle a lieu dans n'importe quelle phase du cycle et serait favorisée par 53BP1 (Bunting *et al.*, 2010). Deux mécanismes NHEJ sont impliqués, l'un est majoritaire et dépendant de l'activité Ku (dimère de KU70 et KU80 responsable de la reconnaissance des cassures), et l'autre est minoritaire et inhibé par Ku. La voie majoritaire peu mutagène est appelée C-NHEJ (voie classique) l'autre voie mutagène est appelée alt-NHEJ (voie alterne, Bennardo *et al.*, 2008).

➤ *La jonction d'extrémités non-homologues classique (C-NHEJ)*

Dans les modèles actuels, la C-NHEJ débute par le recrutement en quelques secondes du complexe Ku (formé des deux sous-unités KU70 et KU80) au niveau de chaque extrémité d'ADN (Mari *et al.*, 2006), grâce à sa forme d'anneau dans laquelle l'extrémité d'ADN s'enfile (Figure 9 A, Walker *et al.*, 2001). Ku recrute alors la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PKcs), qui induit la translocation de Ku vers l'intérieur du brin d'ADN, de manière à ce que la DNA-PKcs soit positionnée au niveau de l'extrémité d'ADN (Mahaney *et al.*, 2009). Le complexe Ku/DNA-PKcs forme l'holoenzyme DNA-PK, ce qui ne peut se produire qu'en présence d'ADN (Yaneva *et al.*, 1997).

L'interaction de deux molécules de DNA-PKcs sur les deux extrémités d'une CDB (une configuration souvent mentionnée comme le complexe synaptique ou synapse) stimule l'activité protéine-kinase de DNA-PKcs, conduisant à l'autophosphorylation de la DNA-PKcs et à sa dissociation (Figure 9 B, Hammel *et al.*, 2010). La DNA-PK joue un rôle critique dans la stabilité des extrémités d'ADN en limitant généralement la résection des extrémités par une série de phosphorylations (Meek *et al.*, 2008).

De plus, selon la complexité de la cassure et la nature des extrémités ADN, des facteurs de maturation peuvent également être recrutés (Figure 9 B, Meek *et al.*, 2008). Ces facteurs incluent Artemis, une endonucléase qui est activée par DNA-PKcs (Jeggo *et al.*, 2002, Drouet *et al.*, 2006), ainsi que le complexe MRN (Zhuang *et al.*, 2009, Xie *et al.*, 2009). Enfin, les polymérases μ et λ complèteraient les nucléotides

Tableau 1. Les protéines de la C-NHEJ, fonctions et syndromes associés.

Fonction	Proteines/complexes	Syndrome (protéine déficiente/hypomorphe)	Symptomes
Protection des extrémités, plateforme de recrutement, phosphorylations	Ku	-	-
	DNA-PKcs	Immunodéficience combinée sévère	Lymphopénie B et T
Jonction des extrémités	XRCC4/Ligase IV/XLF	-	-
		<i>Ligase IV syndrome</i> (Ligase IV)	Microcéphalie, hypogammaglobulinémie, lymphopénie, leucémie lymphoblastique aigue et lymphomes, défauts de croissance
		(XLF)	Microcéphalie, hypogammaglobulinémie, lymphopénie, défauts de croissance
Maturation des extrémités	Artemis	-	Agammaglobulinémie, lymphopénie, lymphomes, défauts de croissance
	Polymerase μ	-	-

manquants (Capp *et al.*, 2006) alors que la polynucléotide kinase/phosphatase (PNKP), qui interagit avec XRCC4 (*X-ray Repair Cross-Complementing group 4*), permet d'enlever un groupe 3' phosphate et/ou d'ajouter un groupe 5'-phosphate avant la ligation (Chappell *et al.*, 2002, Koch *et al.*, 2004) (Figure 9 C). L'étape finale de la C-NHEJ est la ligation de l'ADN par le complexe XRCC4/Ligase IV/XLF (Figure 9 E, Ahnesorg *et al.*, 2006, Riballo *et al.*, 2009) et 53BP1 (Iwabuchi *et al.*, 2003). Les étapes de maturation des extrémités peuvent aboutir à des délétions ou additions de bases au niveau du site de dommage, c'est pourquoi la NHEJ est souvent considérée comme un mécanisme de réparation en partie infidèle. Des perturbations dans la C-NHEJ comme l'absence de ligase IV (Tableau 1), conduisent d'autres ligases (ligase I ou III) à faire la jonction (Ferguson *et al.*, 2001). Néanmoins l'efficacité de ligation paraît moins forte et semble accompagnée d'une perte de nucléotides plus importante (Han *et al.*, 2008).

➤ *La jonction d'extrémités non-homologues alternative (alt-NHEJ)*

La alt-NHEJ est une voie minoritaire qui utiliserait des petites homologies pour rejoindre les extrémités ADN, elle fonctionnerait particulièrement en absence de C-NHEJ (Pan-Hammarstrom, 2005, Verkaik *et al.*, 2002). En effet, elle est responsable de la réparation résiduelle des CDB observée dans les cellules déficientes pour la C-NHEJ (Soulas-Sprauel *et al.*, 2007a, Yan *et al.*, 2007, Cheng *et al.*, 2011). La alt-NHEJ est inhibée par la fixation de Ku aux CDB, par compétition avec PARP1 et le complexe MRN (Cheng *et al.*, 2011). Selon le modèle actuel, l'absence de Ku permettrait à PARP1 de former une synapse en utilisant de petites homologies (>4 pb) de part et d'autre de la CDB et à MRN d'effectuer une résection limitée (5-25 nt) des extrémités. La alt-NHEJ étant indépendante de XRCC4/Ligase IV, la jonction se ferait par l'intervention du complexe XRCC1/Ligase III (Wang, 2005). Des études s'accordent à dire que la alt-NHEJ a une cinétique de réparation plus lente que la C-NHEJ (Kuhfittig-Kulle *et al.*, 2007) et serait moins fidèle, notamment à cause de la résection à l'origine de délétions. Par conséquent, la alt-NHEJ pourrait être un vecteur d'instabilité génomique dans les cellules déficientes pour la C-NHEJ.

Les réarrangements chromosomiques (dont les translocations) font partie des changements les plus récurrents dans beaucoup de cancers, et plus particulièrement les cancers de la lignée hématopoïétique. Ainsi, dans les leucémies aiguës, ces translocations conduisent souvent à la formation de protéines de fusion ayant une capacité à stimuler la prolifération largement supérieure aux protéines sauvages. Ces translocations se produisent lorsqu'au moins deux CDB ont lieu sur des chromosomes différents, et qu'au moins une des extrémités ADN est reliée avec l'extrémité appartenant à l'autre chromosome. Dans les néoplasmes humains où la C-NHEJ est fonctionnelle, ces translocations impliquent quasi systématiquement une réparation par C-NHEJ. A l'inverse, dans les néoplasmes déficients pour la C-NHEJ, ces translocations seraient liées à la alt-NHEJ (Lieber *et al.*, 2010, Yan *et al.*, 2007).

b. La recombinaison homologue

Un second système de réparation est également impliqué dans la réparation des CDB : la recombinaison homologue (RH). Contrairement à la NHEJ qui relie directement les extrémités, la RH est basée sur la recherche de séquences homologues (généralement sur la chromatide sœur) qu'elle utilise comme matrice pour réparer la séquence endommagée. La RH a donc lieu principalement lors des phases S et G2, lorsque la chromatide sœur est présente (You *et al.*, 2010, Karanam *et al.*, 2012). De plus, la RH est cruciale pour la réparation des pontages inter-brins bloquant les fourches de réplication, par l'intermédiaire de la voie de la FA (comme expliqué dans le chapitre I. 1) c.). La plupart des mutations affectant les protéines de la RH sont létales chez les vertébrés, très probablement à cause de son rôle majeur dans la réparation des dommages se produisant pendant la phase S. Donc, l'absence de RH serait fatale lors de la prolifération cellulaire intense caractérisant la croissance du fœtus (Tsuzuki *et al.*, 1996, Sonoda *et al.*, 1998, Buis *et al.*, 2008).

La RH débute par une résection des brins 5', produisant deux extrémités 3' libres. La plupart des détails de cette résection ont été élucidés chez la levure *S. cerevisiae*, pendant la recombinaison méiotique, où la RH joue un rôle crucial. Chez les vertébrés, cette résection est initiée par l'activité exonucléase 3'-5' du complexe MRN

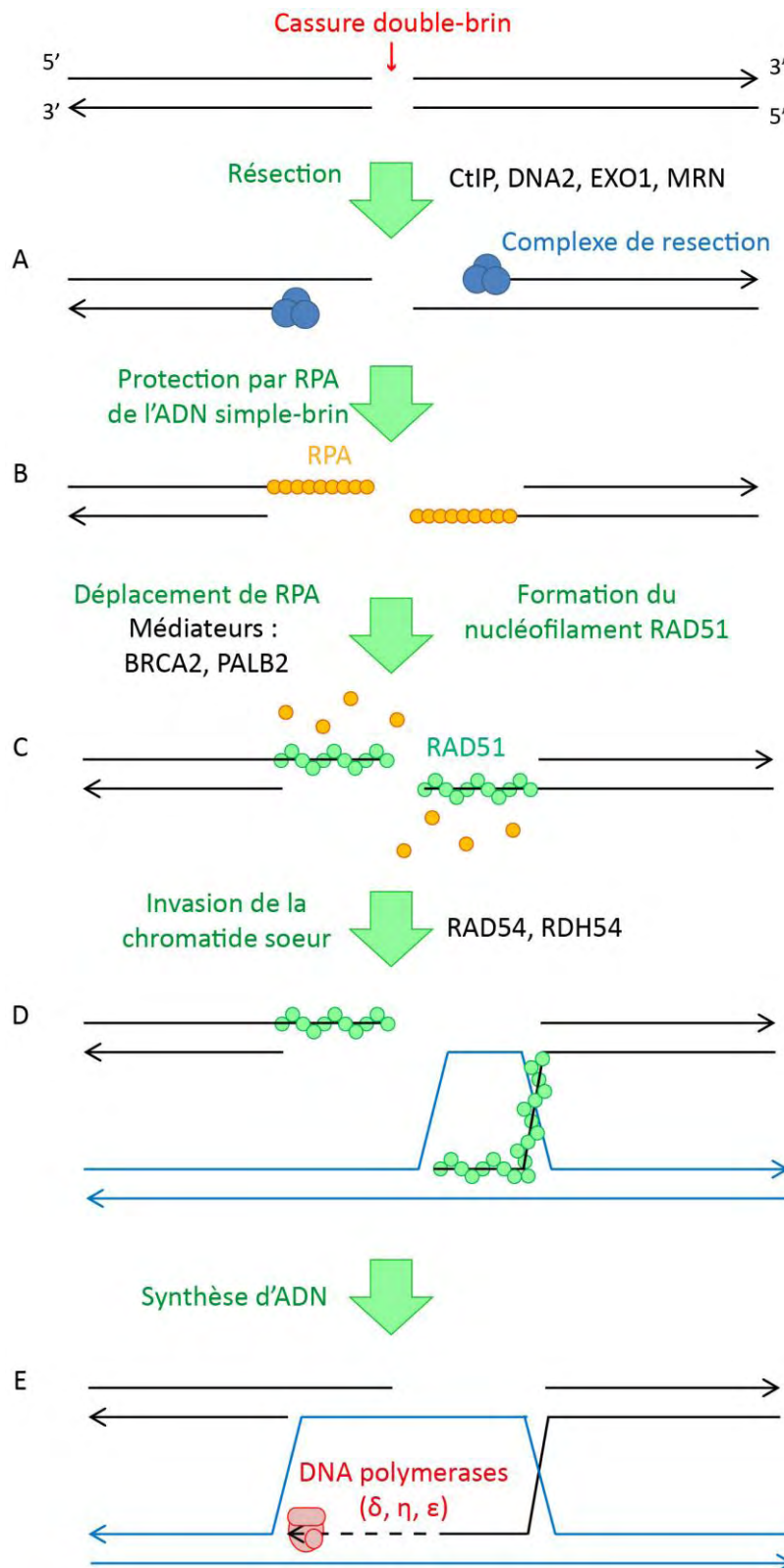


Figure 10. La réparation par recombinaison homologue (1ère partie).

A. Une étape de résection initiale impliquant MRN, CtIP, EXO1 et DNA2 conduit à la formation d'extrémités simple-brin 3'. B. Les simple-brin d'ADN sont recouverts par RPA. C. Les médiateurs de RAD51 (BRCA2, PALB2) déplacent RPA et favorisent la formation du nucléofilament de RAD51. D. Le nucléofilament RAD51 envahit une séquence homologue. E. Des polymérases étendent par synthèse l'extrémité 3' ayant envahi le brin homologue.

(Jazayeri *et al.*, 2008, Paull *et al.*, 1998), couplé à l'endonucléase CtIP (*C-terminal Binding Protein Interacting Protein*) (Sartori *et al.*, 2007) (Figure 10 A). La résection est une étape importante de la RH, comme ont pu le montrer les études sur les allèles hypomorphes de *MRE11* et *NBS1*. En effet, une inactivation partielle de *MRE11* ou une troncature de *NBS1* causent un syndrome « *Ataxia-Telangiectasia-like* » (AT-LD) très proche de celui provoqué par une déficience d'ATM. Comme l'Ataxia Telangiectasia, AT-LD est caractérisée par une hypersensibilité aux radiations ionisantes et une prédisposition aux cancers (Stewart *et al.*, 1999, Varon *et al.*, 1998). Le Knock-out de *MRE11* ou de *NBS1* sont létaux à l'état embryonnaire chez la souris (Buis *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2001). L'inactivation par siRNA de MRN ou de CtIP en cellule humaine conduit à une résection des extrémités ADN plus limitée et donc à une réparation par RH diminuée (Sartori *et al.*, 2007, Ying *et al.*, 2012). En plus du rôle de MRN dans la signalisation des dommages (évoqué dans le chapitre I. 3 b.), ces perturbations dans la résection contribueraient à la sensibilité aux CDB augmentée et à l'instabilité génomique observées dans les cellules AT-LD (Stewart *et al.*, 1999) ou dans les tumeurs mutées pour MRN (Fukuda *et al.*, 2001).

En premier lieu observé chez la levure, une étude *in vitro* à partir de protéines humaines confirme le rôle d'autres protéines venant prolonger la résection initiale jusqu'à 1Kb (Nimonkar *et al.*, 2011). En effet, MRN et CtIP n'effectuent qu'une résection limitée de la cassure ; par conséquent, ils favorisent le recrutement des exonucléases EXO1 (Eid *et al.*, 2010) et DNA2, de l'hélicase BLM (Bloom) et de RPA au niveau des CDB (Nimonkar *et al.*, 2011, Gravel *et al.*, 2008). Ces résultats montrent que, stimulée par MRN, BLM déroule l'ADN et favorise la résection par DNA2 sur plusieurs centaines de bases dans le sens 5'-3'. D'autre part, BLM augmente l'affinité de EXO1 pour les extrémités d'ADN (Nimonkar *et al.*, 2008) et MRN sa processivité (Nimonkar *et al.*, 2011). Enfin, on suppose que d'autres facteurs, comme ATM (qui interagit avec MRN) ou BRCA1-A auraient également une importance dans cette étape de résection, notamment lors du recrutement de CtIP (Moynahan *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2008, Nimonkar *et al.*, 2011). Cette étape aboutit à la formation de longs brins d'ADN à l'extrémité 3' sortante, nécessaires à la poursuite de la RH (Figure 10 A).

Lorsqu'une extrémité simple-brin est exposée dans la cellule, celle-ci est rapidement recouverte par le complexe RPA, complexe dont la structure est très conservée chez la levure, la souris et l'humain. Il est constitué des protéines *Replication Protein A* 1, 2 et 3 (Wold, 1997), et a une forte affinité pour l'ADN simple-brin (Figure 10 B, Sugiyama *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1994). RPA favoriserait la RH en protégeant le simple-brin 3' de la dégradation et en enlevant les structures secondaires formées sur le simple brin (Sung *et al.*, 2003). Par ailleurs, les complexes RPA/ADN simple-brin activent la réponse aux dommages à l'ADN ATR-dépendante (discuté dans le chapitre I. 2) d.), permettant à la RH d'avoir le temps pour réparer la CDB, notamment pendant la phase S (Ball *et al.*, 2007, Choi *et al.*, 2010, Zou, 2003).

La recombinaise RAD51 est ensuite recrutée au niveau du simple brin (Figure 10 C). Mais RAD51 ayant une affinité pour l'ADN simple-brin inférieure à celle de RPA (Sugiyama *et al.*, 1997), des protéines appelées « médiateurs de recombinaison » sont nécessaires pour déplacer RPA et charger RAD51. Ceci permet la formation d'un complexe nucléoprotéique entre l'extrémité simple-brin et le polymère de RAD51, appelé nucléofilament de RAD51. Ces médiateurs sont nombreux et bien caractérisés chez *S. cerevisiae* (Sung *et al.*, 2003). Chez les mammifères, les médiateurs dont l'activité de déplacement de RPA a été caractérisée sont PALB2 (*Partner and localizer of BRCA2*) (Dray *et al.*, 2010) et BRCA2 (Jensen *et al.*, 2010). D'autres protéines favorisent le recrutement de RAD51 au niveau des DSB, mais leur fonction exacte en tant que médiateur reste à prouver. Il s'agit de SWS1 (Martin *et al.*, 2006), SFR1 (Yuan *et al.*, 2011, Haber *et al.*, 2010), et les paralogues de RAD51 : RAD51B, RAD51C, RAD51D (Sigurdsson *et al.*, 2001), XRCC2 (Liu, 2002) et XRCC3 (Fujimori *et al.*, 2001). Si le rôle de médiateur de Rad52 est bien caractérisé chez la levure, l'activité de RAD52 chez l'homme est beaucoup plus floue (Wray *et al.*, 2008), sa fonction de médiateur ayant probablement été supplantée par BRCA2 au cours de l'évolution.

Une fois assemblée, le nucléofilament RAD51 est capable d'interagir avec une seconde molécule d'ADN afin d'initier un échange de brins (Figure 10 D). Bien que des détails de cette étape ne soient pas bien caractérisés pour RAD51 chez les mammifères, les études de son homologue bactérien, RecA, démontrent que la

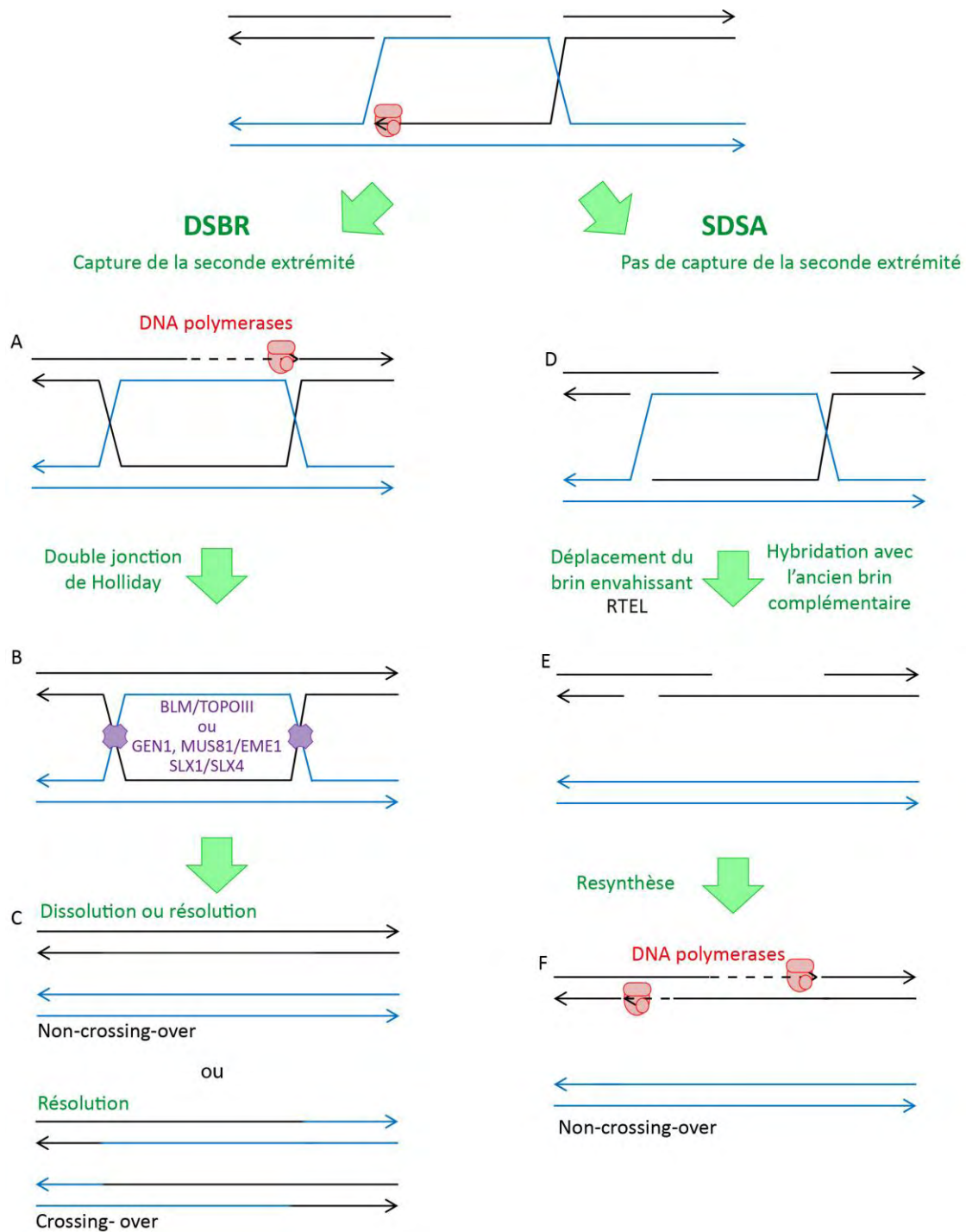


Figure 11. La réparation par recombinaison homologue (2ème Partie) : DSBR et SDSA

La poursuite de la RH se fait en fonction de la capture de la seconde extrémité. A. Le second brin est relié à l'extrémité 3' ayant envahi le brin homologue. Des polymérases synthétisent la portion d'ADN manquante. B. L'intermédiaire de recombinaison alors formé est une double jonction de Holliday. C. Cette structure peut être soit dissoute (Hélicase BLM/TOPOIII) et conduire à un non-crossing-over, soit résolue (par les résolvases GEN1, MUS81/EME1, SLX1/SLX4) et conduire à un crossing-over ou un non crossing-over. D. Sans capture de la seconde extrémité, l'hélicase RTEL (homologue chez les eucaryotes supérieurs de Srs2 chez la levure) désassemble la *D-loop* (E). F. Des polymérases sont recrutées pour compléter les brins d'ADN manquants. Le SDSA ne conduit qu'à des événements de non-crossing-overs.

recherche d'homologie serait rapide et impliquerait des collisions aléatoires entre le nucléofilament et la séquence d'ADN cible (Khodursky *et al.*, 2011). Une fois qu'une homologie est trouvée (généralement sur la chromatide sœur), un échange de brin a lieu entre les deux molécules d'ADN. L'extrémité 3' du nucléofilament envahit le duplex ADN complémentaire et s'hybride avec la séquence homologue cible pour former une « boucle de déplacement » (*displacement loop* ou *D-loop*) (McIlwraith *et al.*, 2000). Après l'invasion, l'extrémité 3' est allongée par synthèse nucléotidique à partir de la séquence homologue utilisée comme matrice (Figure 10 E). Ceci serait possible grâce au recrutement des polymérases δ , η , ϵ au niveau de la *D-loop*, mais les identités et le nombre de polymérases impliquées chez les mammifères restent controversés (McIlwraith *et al.*, 2005, Kawamoto *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, plusieurs modèles existent pour expliquer la suite du déroulement de la RH :

- le modèle *Double Strand Break Repair* (DSBR) a été alimenté par des expériences de recombinaison entre des séquences de plasmides et de chromosomes chez la levure (Szostak *et al.*, 1983, Orr-Weaver *et al.*, 1983, Orr-Weaver *et al.*, 1981). Dans ce modèle, le brin envahissant est capable de se liguer avec l'autre extrémité 5' de la CDB : il s'agit de la « capture de la seconde extrémité » (*second end capture*) (Figure 11 A). D'autre part, l'extrémité 3' non envahissante est également allongée par synthèse d'ADN. Ces deux événements conduisent à la formation d'une double jonction de Holliday (West, 2003). Chez l'Homme, cette jonction peut être dissoute par l'hélicase BLM/TOPOIII (Bachrati *et al.*, 2009) ou résolue par les endonucléases GEN1, MUS81-EME1 (Constantinou *et al.*, 2002, Rass *et al.*, 2010) ou SLX1-SLX4 (Svendsen *et al.*, 2009, Fekairi *et al.*, 2009) (Figure 11 B) et générer -ou non- un événement de crossing-over (Figure 11 C).

- si le modèle DSBR explique de manière adéquate la plupart des observations relatives aux produits de ségrégation méiotiques chez *Neurospora crassa*, il n'est pas cohérent avec la recombinaison observée en mitose chez la levure et la drosophile (Nassif *et al.*, 1994, Virgin *et al.*, 2001). En effet, la quasi-totalité des événements de réparations de CDB ne sont pas associés à des crossing-overs en mitose. Pour respecter

Tableau 2. Les protéines de la RH, fonctions et syndromes associés

Fonction	Proteines/complexes	Syndromes (protéine déficiente/hypomorphe)	Symptômes
Résection des extrémités	MRN	Syndrome Ataxia-telangiectasia like (MRE11)	Ataxie, dégénération cérébrale, apraxie oculomotrice, immunodéficience
		Nijmegen syndrome (NBS1)	Microcephalie, immunodéficience, lymphome des cellules B, défauts de croissance
		(RAD50)	Microcephalie, défauts de croissance
	EXO1	-	cancer colorectal héréditaire sans polypose
	CtIP	Syndrome de Seckel	Retard mental, microcephalie, pancytopenie
	DNA2	-	-
Hybridation avec la séquence homologue et échanges des brins	RAD51	-	-
Protection de l'ADN simple-brin	RPA	-	-
Médiateurs de RAD51	PALB2	Anémie de Fanconi	Défauts de croissance, pancytopenie, malformations, cancers
	BRCA2	Anémie de Fanconi	Défauts de croissance, pancytopenie, malformations, cancers
Médiateurs potentiels de RAD51	XRCC2-RAD51D-SWS1	-	-
	SFR1	-	-
	RAD51B	-	-
	XRCC3-RAD51C	Anémie de Fanconi (RAD51C)	Défauts de croissance, pancytopenie, malformations, cancers
	RAD52	-	-
Extension de l'heteroduplex ADN	RAD54	-	-
	RDH54	-	-
	Polymerases δ , η , ϵ	-	-
Dissolution des jonctions de Holliday (DSBR)	BLM/TOPOIII	Syndrome de Bloom (BLM)	Microcéphalie, retard mental modéré, carcinomes, leucémies, lymphomes, pigmentation anormale de la peau, infertilité, défauts de croissance
Résolution des jonctions de Holliday (DSBR)	GEN1	-	-
	MUS81/EME1	-	-
	SLX1/SLX4	Anémie de Fanconi (SLX4)	Défauts de croissance, pancytopenie, malformations, cancers
Déplacement du brin envahissant (SDSA)	RTKL1	-	-

le modèle DSBR en mitose, il faudrait supposer que les jonctions de Holliday se résolvent presque systématiquement en non-crossing-overs, ce qui est peu probable. Pour éviter cette restriction, un second modèle a donc été proposé : le SDSA (hybridation des brins dépendante de la synthèse, *Synthesis-Dependent Strand Annealing*). Dans ce modèle, la migration de la *D-loop* ne conduit jamais à la capture de la seconde extrémité (Figure 11 D). Au lieu de cela, le brin envahissant est déplacé et s'hybride avec le second brin 3' (Figure 11 E). Les gaps peuvent alors être comblés par synthèse d'ADN classique (Figure 11 F). Puisqu'aucune jonction de Holliday n'est formée, seuls des événements de non-crossing-overs peuvent se produire. Le SDSA serait donc majoritaire en mitose, et impliqué dans une moindre mesure en méiose. Le SDSA serait favorisé chez l'homme par l'hélicase RTEL1 qui provoquerait le déplacement du nucléofilament de RAD51 et conduirait à la dissociation de la *D-loop* (Barber et al., 2008).

Si la RH est un système de réparation très fidèle, elle est avant tout un processus permettant d'établir un lien physique entre deux molécules d'ADN homologues, indispensable pour redémarrer une fourche de réplication effondrée ou pour associer les chromosomes homologues en méiose (Tableau 2).

c. Choix du système de réparation des cassures double-brin

Lorsqu'une CDB survient, la cellule a théoriquement la possibilité de la réparer par NHEJ ou RH. Dans la réalité, ces deux systèmes de réparation sont finement régulés pour n'intervenir que de manière appropriée. En effet, en fonction du type de CDB et de la phase du cycle, la cellule doit pouvoir privilégier l'un ou l'autre pour restaurer la continuité de l'ADN. L'absence de cette régulation, observée chez différents mutants, conduit à des réparations inadéquates, et souvent à une instabilité génomique. Par exemple, l'utilisation inappropriée de RH peut conduire à des pertes d'hétérozygotie. En effet, la RH se base sur la recherche de séquences matrices homologues, généralement sur les chromatides sœurs présentes en S et G2. En cas d'indisponibilité de la chromatide sœur, la RH peut utiliser le chromosome homologue comme matrice. Si la séquence du chromosome homologue diffère à cet endroit, la

séquence recopiée est différente de la séquence initiale, ce qui peut conduire à une perte d'hétérozygotie. Si la CDB survient dans des séquences répétées (comme les ADN_r, les séquences microsatellites, les éléments répétés, les gènes paralogues...), la séquence matrice utilisable peut se trouver sur différents chromosomes. La réparation par RH peut ainsi conduire à des translocations ou des modifications de la longueur de ces séquences. Enfin, l'utilisation inappropriée de la RH peut être due à une déficience des protéines chargées de réprimer cette voie, comme les anti-recombinases, qui inhibent la formation du filament RAD51 (telles HELQ, RAD54 et PARI (Ward *et al.*, 2010, Solinger *et al.*, 2002, Moldovan *et al.*, 2012)). La déficience de d'anti-recombinases, comme la surexpression de RAD51, dérégulent les nucléofilaments RAD51 et provoquent des translocations chromosomiques (Moldovan *et al.*, 2012).

A l'inverse, les CDB survenant au niveau de la fourche de réplication (cassures directes ou provoquées par un effondrement de fourche) doivent principalement être prises en charge par RH. En effet, une CSB du *leading* ou du *lagging strand* conduit à la formation d'une CDB constituée d'une seule extrémité. En l'absence d'une deuxième extrémité à relier directement, la NHEJ ne peut fonctionner correctement, et la cellule s'expose à la jonction d'extrémités issues d'autres CDB et donc à des réarrangements chromosomiques. Dans ce cas, la RH est nécessaire pour faire repartir la fourche de réplication sans translocations.

La régulation de ces deux systèmes de réparation se fait à plusieurs niveaux : d'une part cette régulation est largement conditionnée par les phases du cycle cellulaire et d'autre part, la maturation des extrémités ADN oriente également la réparation. Enfin, le recrutement de facteurs dirigeant la prise en charge de la CDB est également à prendre en compte. Ces trois niveaux de régulation sont intimement liés.

➤ *Influence du cycle cellulaire sur la résection et la réparation*

Comme expliqué au-dessus, la nécessité d'utiliser la RH ou la NHEJ pour réparer des lésions dépend en partie de la phase du cycle. Tout d'abord, étant donné que la présence de la chromatide sœur est limitée aux phases S et G₂, l'activité de la RH est

restreinte à ces phases pour assurer une réparation efficace. C'est pourquoi la présence et l'activité de facteurs de la RH sont stimulées pendant ces phases.

En effet, chez les vertébrés, les CDK limitent la résection des extrémités ADN essentiellement aux phases S et G2 (Jazayeri *et al.*, 2006), afin d'initier la RH pendant ces phases. Cette stimulation de la résection passerait notamment par la phosphorylation de CtIP dépendante de CDK2, et qui favoriserait la formation du complexe CtIP-MRN-BRCA1 (Chen *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les niveaux de plusieurs facteurs impliqués dans les systèmes de réparation varient au cours du cycle. L'expression de BRCA1 et 2 est augmentée pendant les phases S et G2 (Chen *et al.*, 2008, Rajan *et al.*, 1996), et les niveaux de CtIP sont plus élevés en G2 car sa dégradation par le protéasome est réduite par rapport à celle de la phase G1 (Buis *et al.*, 2012).

➤ 53BP1 et BRCA orientent la réparation par NHEJ ou par RH

Les facteurs énoncés ci-dessus ne sont pas les seuls à intervenir dans la décision du type de réparation. Les scientifiques ont longtemps soupçonné l'implication des facteurs initiateurs de la NHEJ ou de la RH dans ce choix, tels que l'hétérodimère KU70/80 (Ku) et le complexe MRN. En effet, des études biochimiques et chez la levure ont notamment démontré l'importance de Ku pour limiter la résection des extrémités (Frit, 2000). Néanmoins, ce rôle semblerait ne pas être complètement conservé, puisque la perte de KU80 a un effet moins prononcé sur la résection chez la souris (Bunting *et al.*, 2012). En revanche, la déficience de 53BP1 conduit à une résection plus importante, bien qu'elle ne fasse pourtant pas partie des protéines « centrales » de la NHEJ.

➤ 53BP1 favorise la NHEJ et inhibe la RH

Le mécanisme par lequel 53BP1 favorise la NHEJ au détriment de la RH n'est que partiellement caractérisé. Pendant la commutation isotypique (*Class Switch*

Recombination, CSR), AID provoque la formation de plusieurs CDB séparées de 60 à 200 Kb dans les régions *switch* du gène codant pour la chaîne lourde de l'immunoglobuline. Ces événements ont lieu durant la phase G1, dépendent normalement de la NHEJ classique, et sont indispensables pour l'assemblage d'anticorps de différentes classes (Stavnezer *et al.*, 2008). Seules les cellules B avec des anticorps correctement assemblés peuvent survivre à l'issue de la CSR. De manière intéressante, la déficience en 53BP1 induit un défaut important de CSR, puisqu'on observe une diminution de 90% de cellules B dans les souris 53BP1 *-/-* par rapport aux *wild-type* (Manis *et al.*, 2004, Ward, 2004). Par ailleurs, la perte de 53BP1 aurait également une influence néfaste sur la jonction d'extrémités éloignées lors de la recombinaison V(D)J (Difilippantonio *et al.*, 2008). Deux propriétés permettraient à 53BP1 de stimuler la jonction d'extrémités si éloignées : sa capacité à inhiber la résection des extrémités de CDB et sa faculté à maintenir des extrémités ADN pourtant éloignées, qui forment alors une synapse.

Les rôles d'inhibition de résection et de maintien des extrémités par 53BP1, s'ils sont clairement inspirés des études chez son homologue de *S. pombe* (Lazzaro *et al.*, 2008), ont également été démontrés chez les mammifères : une CSR induite artificiellement chez la souris par le clivage de deux sites I-SceI (enzyme de restriction) introduits dans le locus de la chaîne lourde de l'immunoglobuline, montrent que 53BP1 est important pour maintenir une synapse et joindre ces extrémités éloignées (Bothmer *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'absence de 53BP1 n'a pas d'influence sur la jonction de séquences loxP (placés aux mêmes endroits que les sites I-SceI) par la recombinase Cre, car celle-ci possède sa propre activité synaptique. Enfin, dans les cellules 53BP1 *-/-*, les sites I-SceI sont sujets à une résection excessive, et seule une faible proportion est réparée, probablement par des mécanismes alternatifs de la NHEJ qui ne permettent pas d'obtenir une CSR correcte. Ces résultats renforcent l'hypothèse du rôle « anti-résection » de 53BP1.

➤ *BRCA1 favorise la RH et inhibe la NHEJ*

Si 53BP1 oriente la réparation vers la NHEJ au détriment de la RH, BRCA1 possède la faculté inverse. En effet, les études montrent un comportement de BRCA1 opposé à 53BP1 en favorisant la RH, même si les détails sont mal connus.

Certaines études décrivent la manière dont BRCA1 stimule la RH. Sans BRCA1, les cellules humaines subissent spontanément des translocations chromosomiques (Moynahan *et al.*, 1999). Elles possèdent un réel défaut de RH qui les empêche de réparer correctement des CDB se produisant pendant la phase S (ou de faire redémarrer des fourches de réplication bloquées). C'est pourquoi ces cellules sont hypersensibles à un traitement à la camptothécine, aux inhibiteurs de PARP, ou encore aux agents pontants (Helleday, 2011). Ces substances représentent donc des stratégies intéressantes contre les cancers du sein mutés pour BRCA1, car en l'absence de RH, les CDB sont réparées de manière inadéquate par NHEJ (Bunting *et al.*, 2010), conduisant à une instabilité chromosomique trop importante, donc létale.

BRCA1 interagit directement avec BRCA2 et PALB2, deux médiateurs de RAD51 essentiels pour la RH (Sy *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009). Cette interaction pourrait être requise pour coordonner l'assemblage des facteurs de la RH, puisque BRCA1 favorise l'accumulation de PALB2, qui lui-même favorise le recrutement de BRCA2 au niveau des CDB.

Enfin, le domaine BRCT de BRCA1 est capable de lier les motifs Ser-X-Phe de BACH1, CtIP et Abraxas, phosphorylés par les CDK pendant les phases S et G2 (Huen *et al.*, 2009). Ce domaine est essentiel pour la RH, puisque les MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) déficients pour ce domaine BRCT sont hypersensibles au cis-platine et ont des défauts de prolifération et de RH, ce qui favorise l'apparition de cancers dans les souris (Shakya *et al.*, 2011). CtIP est également ubiquitiné par le complexe BRCA1/BARD1, mais aucune influence sur l'activité de CtIP n'a pu être encore démontrée (Yu, 2006).

La manière dont BRCA1 favorise la RH grâce à ses partenaires nécessite donc plus d'investigations pour être élucidée.

➤ *Les rôles antagonistes de 53BP1 et BRCA1*

En plus de stimuler chacun un système de réparation différent, il semble que 53BP1 et BRCA1 aient également des effets antagonistes l'un envers l'autre.

L'importance de BRCA1 et 53BP1 aux CDB a en partie été dévoilée par les expériences dans les cellules BRCA1 *-/-*, sujettes à une instabilité génomique et à une déficience en RH (Moynahan *et al.*, 1999). La perte de 53BP1 dans ces cellules compense la déficience de BRCA1 en restaurant la RH (Bouwman *et al.*, 2010, Bunting *et al.*, 2010). Par ailleurs, la déficience en BRCA1, qui est létale à l'état embryonnaire chez la souris, peut être compensée par la perte de 53BP1 (Bunting *et al.*, 2010, Bouwman *et al.*, 2010). Ces études ont ainsi pu mettre en valeur les rôles antagonistes de BRCA1 et 53BP1 au niveau des CDB, le premier favorisant la RH et inhibant la C-NHEJ, tandis que 53BP1 favoriserait la C-NHEJ au détriment de la RH.

Pour mieux comprendre la relation entre ces deux protéines au niveau de la CDB, leur présence a été analysée aux IRIF (Foyers induits par les radiations ionisantes). Bien que le recrutement de ces deux protéines aux CDB nécessite une étape d'ubiquitination, l'analyse 3D des IRIF montre que les marquages 53BP1 et BRCA1 ne se superposent pas forcément aux IRIF (Mok *et al.*, 2010). En effet, la microscopie à haute résolution montre que si 53BP1 occupe l'intégralité du foyer en G1, le recrutement de BRCA1 au niveau du cœur du foyer pendant la phase S exclut 53BP1 à la périphérie de l'IRIF (Chapman *et al.*, 2012), les deux protéines occupant alors un volume essentiellement exclusif. Ces données sont cohérentes avec l'action antagoniste de BRCA1 envers 53BP1, dans le but de favoriser la RH pendant la phase S.

Le mécanisme par lequel BRCA1 interagit avec 53BP1 au niveau des IRIF est mal connu. BRCA1 inhibe-t-il directement l'action de 53BP1 ou de façon indirecte en empêchant la relocalisation de 53BP1 à la CDB ? Un élément de réponse est apporté *via* les partenaires de BRCA1 : BAP1 et BRCC36, deux déubiquitinases. BRCC36 est capable de déubiquitiner les chaînes de polyubiquitines présentes sur H2A et H2AX, impliquées dans le recrutement de 53BP1 et de BRCA1 (Shao *et al.*, 2009), suggérant une inhibition indirecte.

5) Mutations et instabilité génétique

Les systèmes de détection et de réparation des dommages assurent la protection de notre génome contre les dommages à l'ADN, afin d'assurer la survie de la cellule. Néanmoins, ces systèmes ne sont pas infailibles et peuvent être à l'origine de mutations dans de rares cas. En effet, l'efficacité et la fidélité des systèmes de réparation varient en fonction du dommage, du nombre de lésions, mais également des phases du cycle cellulaire. Par exemple, la NHEJ, lors de la maturation d'extrémités, peut conduire à des petites additions/délétions de bases. De plus, les dommages se produisant pendant la phase S sont dangereux pour la cellule : ils sont sources de translocations chromosomiques dans le cas de CDB, ou de substitutions dans le cas de dommages encombrants nécessitant une synthèse translésionnelle. Par conséquent, le risque de développer des mutations peut être directement corrélé aux nombres de dommages subis, et donc à l'exposition d'agents génotoxiques. Les mutations peuvent changer l'information génétique et provoquer le dysfonctionnement de protéines essentielles conduisant la cellule à s'autodétruire. Dans des cas plus rares, la mutation peut conférer un avantage sélectif, permettant à la cellule affectée de mieux survivre ou de mieux proliférer par rapport aux autres cellules du tissu environnant. Ce genre de mutation favorise ainsi la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Les gènes impliqués dans ce phénomène sont généralement classés en deux catégories : les « oncogènes » et les « gènes suppresseurs de tumeur ». Comme leur nom l'indique, les gènes suppresseurs de tumeurs regroupent les gènes qui empêchent les cellules de devenir cancéreuses, le dysfonctionnement de tels gènes pouvant ainsi conférer l'avantage sélectif évoqué plus haut. A l'inverse, les oncogènes peuvent favoriser le développement tumoral si des mutations aboutissent à leur surexpression, leur duplication ou encore à une protéine constitutivement active. Pour illustration, l'oncogène K-ras, qui normalement stimule la prolifération et la survie en réponse aux facteurs de croissance, est muté dans environ 30% à 90% des cas selon les tumeurs (Bos, 1989). Il s'agit souvent de mutations ponctuelles bloquant K-ras dans sa forme active, mimant ainsi l'apport constant de facteurs de croissance et stimulant fortement la prolifération (Reddy *et al.*, 1982).

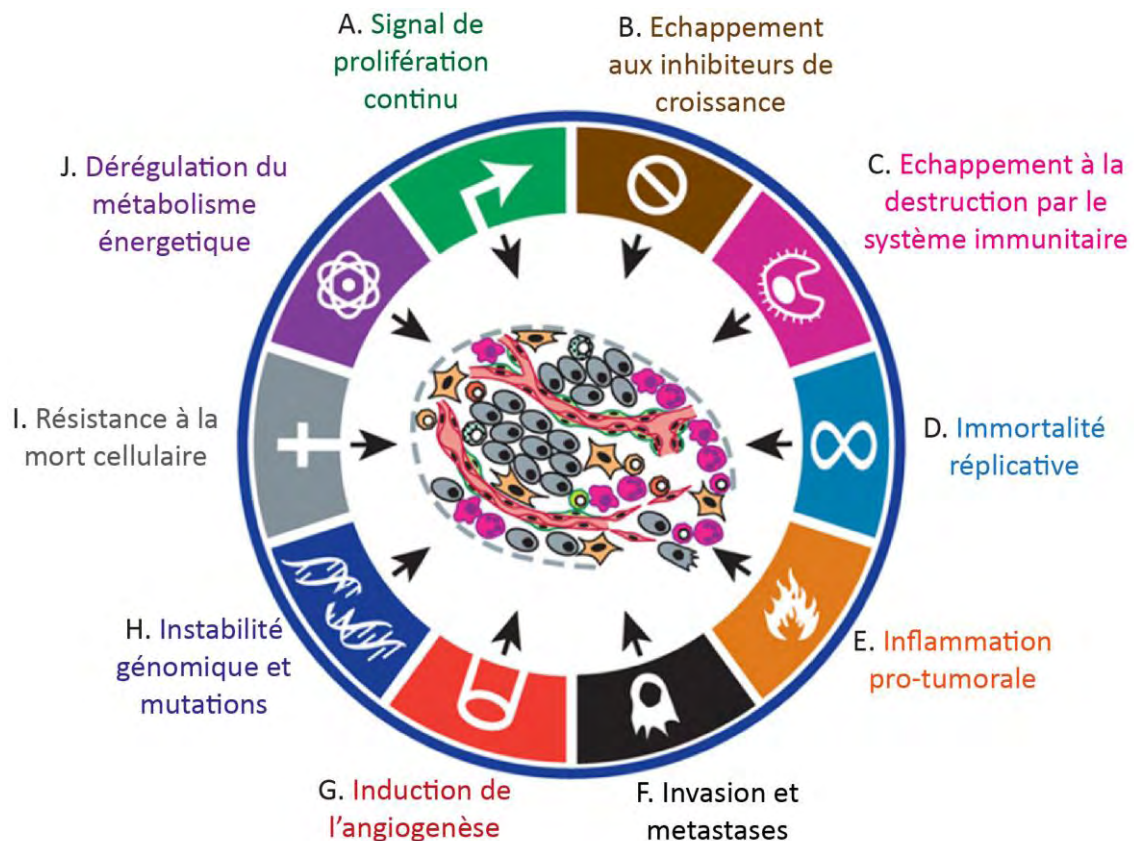


Figure 12. Les caractéristiques classiques des cellules cancéreuses.

A. Les cellules cancéreuses ont une **prolifération plus rapide** que les cellules saines du tissu environnant. Des mutations des points de contrôle du cycle peuvent être impliquées. B. Les cellules cancéreuses sont **insensibles aux signaux inhibiteurs de croissance**, ce qui rend leur prolifération incontrôlable par l'organisme. C. Les cellules cancéreuses possèdent des systèmes d'échappement permettant **d'éviter leur élimination par le système immunitaire**, censé stopper l'émergence de telles cellules dans l'organisme (par exemple, des mutations dans les marqueurs membranaires utilisés par le système immunitaire pour détruire les cellules cancéreuses). D. La taille des télomères limite la prolifération des cellules saines. Les cellules cancéreuses sont **immortelles** car des mutations réactivent la capacité des cellules à maintenir la longueur des télomères grâce à la télomérase. E. Par des mécanismes **pro-inflammatoires**, les cellules cancéreuses peuvent promouvoir la progression tumorale en influençant leur microenvironnement. F. Des propriétés permettant **l'invasion** émergent chez les cellules tumorales, permettant à la tumeur de s'étendre aux tissus proches. Egalement, certaines cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'essaimer à partir de la tumeur primaire grâce à la circulation sanguine. Ces cellules peuvent s'implanter dans d'autres zones de l'organisme pour se développer et former des **métastases**. G. Au fur et à mesure de la croissance tumorale, l'accès aux nutriments et oxygène se fait plus difficile au centre de la tumeur. Pour améliorer leur perfusion, les cellules tumorales produisent des facteurs induisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins alimentant la tumeur : c'est **l'angiogenèse tumorale**. H. **L'instabilité génomique** est caractérisée par la propension des cellules à accumuler des mutations de l'ADN, pouvant altérer les gènes et donc les différentes fonctions de la cellule. Cette instabilité favorise l'acquisition de la plupart des caractéristiques des cellules tumorales. I. Les cellules cancéreuses sont **résistantes à l'apoptose** grâce à des mutations qui affectent essentiellement les gènes des checkpoints ou de la voie apoptotique. J. Pour soutenir cette prolifération anarchique intense, les cellules cancéreuses ont un **métabolisme cellulaire dérégulé** leur permettant de produire suffisamment d'énergie. Adapté de Hanahan *et al.*, 2011 .

Le phénomène qui transforme une cellule saine en cellule cancéreuse est progressif. Ainsi, les cellules portant des mutations « promotrices » (telles que K-ras) favorisant la cancérisation, transmettent leurs gènes mutés à leurs cellules filles au fil des divisions. D'autres mutations promotrices peuvent alors se produire et se transmettre grâce à l'avantage sélectif qu'elles confèrent, rapprochant toujours plus les cellules filles du stade cancéreux. Le taux de mutations dans ces cellules peut radicalement augmenter si l'une des mutations touche notamment les gènes de réparation. S'ils sont altérés, la cellule acquiert alors un phénotype *mutator*, accumulant encore plus de mutations, et donc les avantages sélectifs potentiels. Par conséquent, au fil des divisions, le génome des cellules mutées subit une réelle « instabilité », cette instabilité agissant comme un moteur de la tumorigénèse.

a. L'instabilité génomique comme moteur du cancer

L'instabilité génomique constitue une passerelle entre la cellule normale et la cellule cancéreuse. L'intégralité des caractéristiques des cellules cancéreuses s'explique par les mutations découlant de l'instabilité génomique (Figure 12). Par ailleurs, l'accumulation rapide de mutations dans les cellules tumorales confère une adaptabilité et donc une résistance à de nombreux traitements anticancéreux. Ceci expliquerait en partie pourquoi, après un premier traitement conduisant à une régression ou à une élimination tumorale apparente, celle-ci parvient parfois à poursuivre son développement tout en étant résistante. Cependant, d'autres facteurs seraient également impliqués dans l'acquisition de résistances, comme l'environnement de la tumeur et les modifications épigénétiques des cellules tumorales.

Les événements conduisant aux mutations initiatrices ou promotrices de cancers sont nombreux et complexes. Comprendre leur origine et leur impact sur le génome humain permet non seulement d'analyser le développement tumoral, mais également de concevoir de meilleures approches thérapeutiques. L'instabilité génomique peut être divisée en trois catégories distinctes : l'instabilité nucléotidique, de répétitions, ou chromosomique.

b. L'instabilité nucléotidique

L'instabilité nucléotidique est liée à l'accumulation de mutations réparties sur des séquences ADN de très petite taille, telles des mutations ponctuelles, ou petites additions/délétions de bases. Ce genre d'instabilité est lié à des altérations de nucléotides (causées par exemple par des agents mutagènes et des défauts dans les systèmes de réparation corrigeant ces altérations, tels que le BER et le NER). Grâce à la redondance du code génétique et l'efficacité des systèmes de réparation, il y a un risque faible mais non nul que ces mutations altèrent le fonctionnement de protéines. Néanmoins, l'instabilité nucléotidique est augmentée lorsque certains composants des systèmes de réparations sont déficients. C'est le cas pour les personnes atteintes de syndrome myélodysplasique (dont certains cas sont dus à une déficience du BER, Jankowska *et al.*, 2008) ou *Xeroderma pigmentosum* (Déficience du NER, Robbins *et al.*, 1974).

c. L'instabilité de séquences répétées.

Les séquences microsatellites sont des séquences d'ADN de 2 à 6 paires de bases répétées : par exemple, les séquences microsatellites les plus répandues sont les répétitions de dinucléotides CA ou GT, qui sont répétées parfois plusieurs dizaines de milliers de fois. Bien que la longueur de ces séquences microsatellites soit très variable d'une personne à une autre, chaque individu possède des microsatellites d'une longueur définie. La présence de telles séquences est normale, leurs tailles sont d'ailleurs analysées pour obtenir des empreintes génétiques afin d'identifier un individu en médecine légale. Cependant, si la longueur de ces séquences varie au sein d'un même individu sur un locus donné, on parle d'**instabilité microsatellite**. Non seulement l'expansion de microsatellites au sein d'un gène conduit à des maladies telles que la maladie de Huntington (Gusella *et al.*, 1983), la maladie de Kennedy (La Spada *et al.*, 1992), le syndrome X-fragile (Turner *et al.*, 1980), mais l'instabilité microsatellite peut également être liée à des cancers héréditaires tel le Cancer Colorectal Héréditaire sans Polypose (HNPCC, ou syndrome de Lynch) (Thibodeau *et al.*, 1993). L'expansion et la réduction des microsatellites se produisent lorsque ces

régions sont mal répliquées et conduisent à des défauts d'interactions entre brins d'ADN complémentaires, normalement réparés par le MMR (Figure 1). L'apparition du HNPCC peut être alors favorisée par des déficiences transmissibles partielles dans le MMR, causées par des mutations mono-alléliques ou des hyperméthylations de promoteurs de protéines du MMR, telle MLH1. Les rares cas de mutations bi-alléliques souffrent du syndrome constitutivement déficient en réparation des mésappariements de bases (CMMR-D), ce qui les expose à diverses formes de cancers (essentiellement des cancers du sang, du cerveau ainsi que des cancers colorectaux) dès l'enfance (Ricciardone *et al.*, 1999).

d. L'instabilité chromosomique

Les premières preuves d'instabilités chromosomiques dans les cellules cancéreuses furent observées il y a près d'un siècle (Bovari, 1914, Hanseemann, 1903) ; elles concernent des altérations sur des séquences d'ADN plus importantes, à l'échelle d'un ou plusieurs chromosomes. Ces « aberrations chromosomiques » rassemblent les gains ou pertes de chromosomes entiers, ainsi que les inversions, délétions, duplications, translocations de longs segments chromosomiques et aneuploïdie. L'origine de cette instabilité au sein des cancers est encore très discutée à l'heure actuelle. Un nombre aberrant de chromosomes dans une cellule peut être la conséquence de perturbations lors de la mitose : par exemple, si la duplication des centrosomes est perturbée et qu'il y a plus de deux centrosomes (Pihan *et al.*, 1998), le fuseau mitotique ne peut pas s'assembler correctement et ceci aboutit à des problèmes de ségrégation en mitose. D'ailleurs, les centrosomes sont en surnombre dans environ 80% des cancers du sein (Lingle *et al.*, 2002) et beaucoup d'autres cancers. Le reste des aberrations chromosomiques peut découler de CDB multiples, dont les extrémités d'ADN ne sont pas rejointes fidèlement, comme lorsque la NHEJ ou la RH sont déficientes ou utilisées de manière inadéquate. C'est le cas dans plusieurs cancers, mais aussi dans des syndromes caractérisés par une instabilité chromosomique importante et une prédisposition aux cancers : L'*Ataxia Telangiectasia* (et syndromes associés), le *Nijmegen breakage syndrome* (Weemaes *et al.*, 1981), le

syndrome de RIDDLE (Stewart *et al.*, 2007) et l'immunodéficience sévère T-B combinée (van der Burg *et al.*, 2009).

6) L'importance de prévenir la génotoxicité

Quotidiennement, notre organisme fait donc face à un nombre colossal de dommages à l'ADN, qu'il gère grâce à des systèmes de réparation très efficaces. Néanmoins, ceux-ci ont leurs limites, et induisent occasionnellement des mutations. Par conséquent, l'exposition à un agent génotoxique augmente sensiblement le risque de mutation, notamment en fonction du mode d'action et du type de dommage induit par ce génotoxique. Il est donc capital de développer des outils pour évaluer efficacement le potentiel génotoxique d'agents en contact avec nos cellules, mais également de mener des études élucidant les mécanismes d'action de ces toxiques.

C'est pourquoi, au cours de ma thèse, j'ai participé à l'élaboration d'un outil visant à détecter des CDB en temps réel. Cet outil a pour but de fournir des informations sur la cinétique des CDB, grâce à une approche *in cellulo*. Mon travail s'est également porté sur une génotoxine bactérienne, la *Cytolethal Distending Toxin* (CDT), dont le risque carcinogène été constaté en modèle murin (Ge *et al.*, 2007). Dans un premier temps, j'ai contribué à une meilleure compréhension de son mécanisme d'action et dans un second temps, j'ai permis d'éclaircir certaines particularités de la cytotoxicité de CDT. Enfin, mon travail révèle que CDT représente un risque génotoxique, même à faible dose. Ces deux travaux sont développés par la suite dans deux parties distinctes.

II. Les Nanobodies comme marqueurs de cassures double-brin

1) Comment détecter les CDB ?

Différentes techniques permettent d'évaluer, directement ou indirectement les agents potentiellement clastogènes.

a. Les essais directs

Certaines techniques permettent d'estimer directement l'état de dégradation de l'ADN, comme l'essai COMET en conditions neutres ou alcalines. Lors de ce test, les cellules dont l'ADN est potentiellement endommagé sont isolées et incluses, sur lame, dans un microgel d'agarose. Leur ADN est dénaturé et soumis à un champ électrophorétique faisant migrer l'ADN et formant une « queue » à partir du noyau, ressemblant à une comète. Plus l'ADN est dégradé, plus il migre loin : donc la longueur de la queue de la comète en condition alcaline reflète indistinctement la quantité de CSB, double-brin et/ou sites alcali-labiles. En condition neutre, ce sont majoritairement les CDB qui sont visualisées par la formation de queues de comètes

L'électrophorèse en champ pulsé est aussi une technique qui révèle directement les CDB. Dans ce cas, 10^3 - 10^4 noyaux des cellules sont inclus dans le même puits d'agarose. Néanmoins, ces techniques souffrent d'une intervariabilité certaine, et nécessitent une expertise pour être développées et interprétées au sein d'un laboratoire.

b. Les essais indirects

D'autres approches analysent les conséquences de CDB, par exemple des modifications à l'échelle du chromosome.

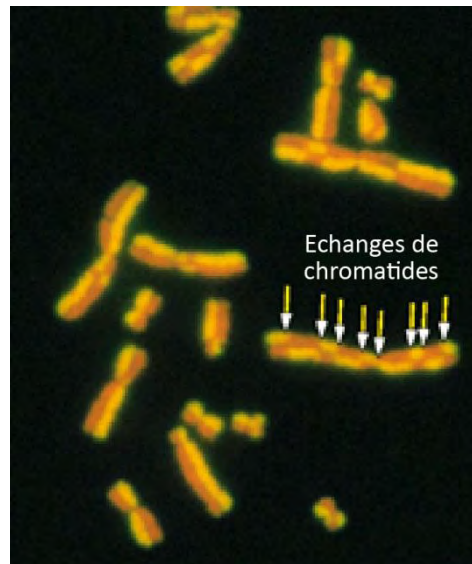


Figure 13. Test d'échange de chromatides sœurs.

Un marquage différentiel par bromodeoxyuridine permet de distinguer les chromatides sœurs en métaphase. Les échanges de chromatides, consécutifs à des événements de CDB réparées, sont indiqués par des flèches sur un chromosome. Image source : www.crios.be.

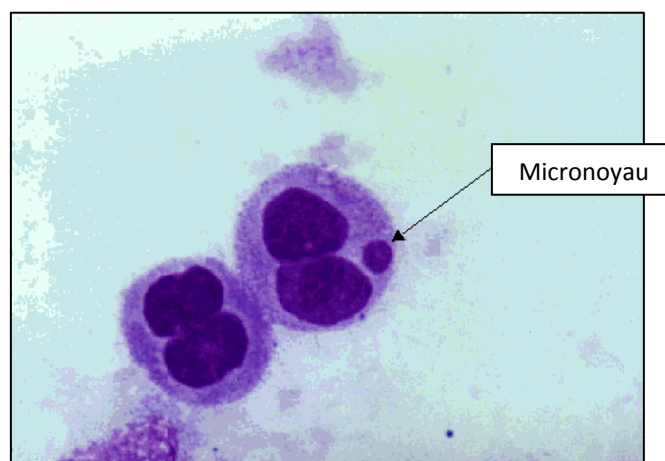


Figure 14. Test des micronoyaux.

Des cellules en prolifération sont traitées à la cytochalasine B, un inhibiteur d'actine empêchant la scission après mitose et les noyaux sont marqués (ici au Giemsa). Les cellules ayant effectué une mitose correcte présentent deux noyaux distincts (à gauche). Les cellules présentant des anomalies de ségrégation peuvent former des micronoyaux supplémentaires (flèche). Image source : www.crios.be.

➤ *Test d'échange des chromatides sœurs*

Le test d'échange de chromatides sœurs permet de déterminer si des CDB ont été réparées par RH. Lors de la réplication, les cellules sont traitées par un nucléotide modifié qui marque l'ADN néosynthétisé et donc différemment les deux chromatides sœurs (Figure 13). En métaphase, lorsque l'ADN est sous forme de chromosomes, les deux chromatides sœurs sont visibles et il est possible d'estimer s'il y a eu échange de séquences entre elles si le marquage est discontinu sur les deux chromatides (Figure 13). Ces échanges de chromatides sœur sont la conséquence de cassures de l'ADN réparées par RH aboutissant à un évènement de crossing-over.

➤ *Test des micronoyaux*

La réparation des CDB n'est pas systématiquement fidèle, et peut conduire à des aberrations chromosomiques. Le test des micronoyaux estime l'incidence de ces aberrations en recherchant les défauts de ségrégations chromosomiques lors de la mitose. En effet, si une extrémité double-brin d'ADN est reliquée avec une extrémité issue d'un autre chromosome ou mal reliquée, des fusions chromosomiques ou des chromosomes sans centromère peuvent en résulter. Lors de la mitose, ces chromosomes ne se répartissent pas correctement sur la plaque métaphasique et les chromosomes aberrants sont inclus dans des bourgeonnements du noyau, appelés micronoyaux (Figure 14). Si la présence de micronoyaux est généralement la conséquence de CDB mal/non réparées, des agents perturbant le fuseau mitotique, et ne causant pas de dommage à l'ADN, peuvent causer l'inclusion de chromosome(s) dans des micronoyaux.

➤ *Test des aberrations chromosomiques*

Les conséquences de tels réarrangements chromosomiques sont visibles également grâce au test des aberrations chromosomiques (Figure 15 A, Clare, 2012). Le but de ce test est d'analyser la morphologie et le nombre de chromosomes métaphasiques par cellule, afin d'évaluer la présence d'anomalies chromosomiques : perte ou gain de chromosome, multiplication du nombre total de chromosomes

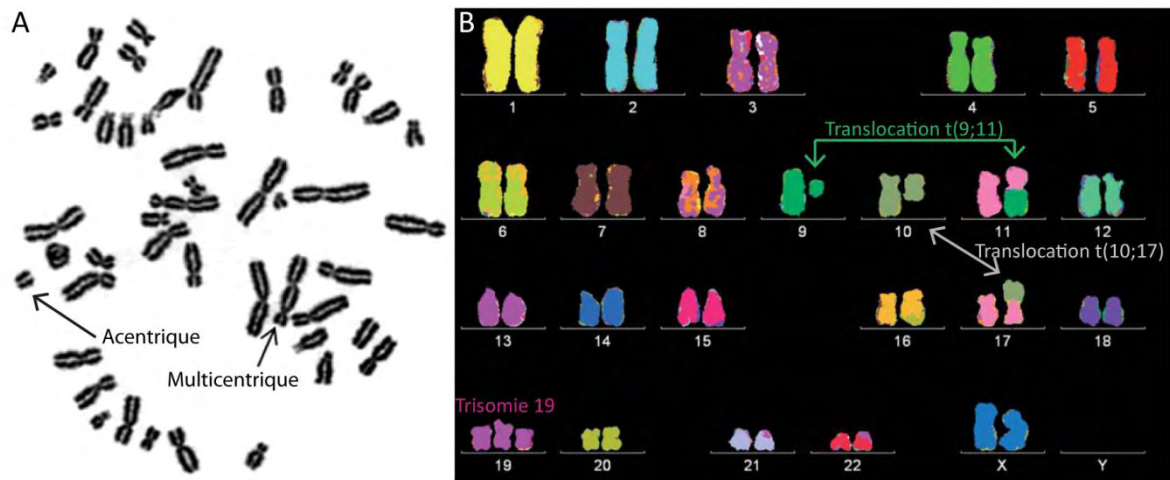


Figure 15. Tests d'aberrations chromosomiques.

A. Test d'aberrations chromosomiques classique. Le marquage de chromosomes métaphasiques peut révéler certaines aberrations chromosomiques. Deux d'entre elles (chromosome multicentrique et chromosome acentrique) sont indiquées par des flèches. B. Chromosome painting. L'utilisation de sondes spécifiques de chromosomes permet de tirer plus d'informations du test d'aberrations, notamment l'origine chromosomique de la translocation. Les translocations sont indiquées par des flèches : échanges chromosomiques entre chromosomes des paires 9 et 11 (flèche verte), échanges entre les paires 10 et 17 (flèche grise), Trisomie 19 (rose) (Amant *et al.*, 2011).

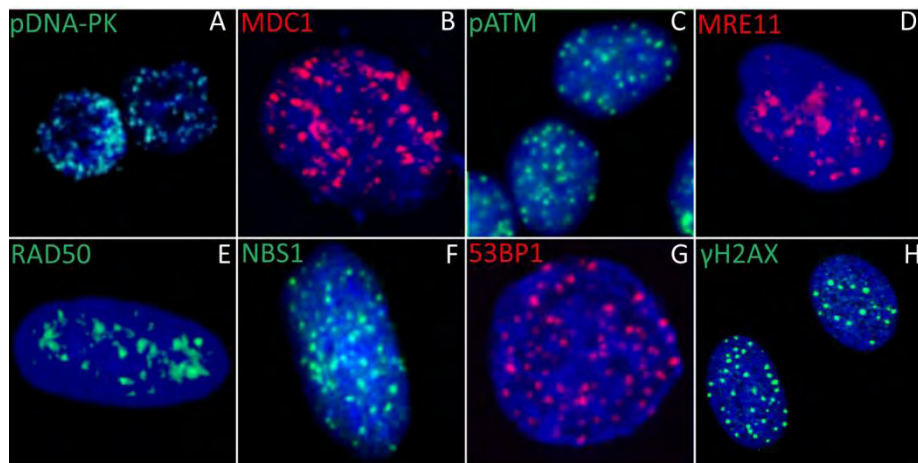


Figure 16. Exemple de marqueurs de cassures double-brin.

Les cellules suivantes sont irradiées aux rayonnements gamma et les protéines indiquées sont marquées par immunofluorescence. Bleu : DAPI. A. Cellules de cancer du poumon non à petites cellules (*Non-Small-Cell Lung Carcinoma*, NSCLC) irradiées 10 Gy (Azad *et al.*, 2011). B. Cellules HeLa irradiées 5 Gy (Moon *et al.*, 2010). C. Cellules HeLa irradiées 2 Gy (Kobayashi *et al.*, 2009). D. Fibroblastes humains irradiés 12 Gy (van Veelen *et al.*, 2005). E. Fibroblastes primaires humains irradiés 12 Gy (van Veelen *et al.*, 2005). F. Fibroblastes humains irradiés 3 Gy (Stewart *et al.*, 2007). G. Cellules HeLa irradiées 5 Gy (Moon *et al.*, 2010). H. Lymphocytes humains irradiés 10 Gy (Sak *et al.*, 2010).

(polyploidie), chromosomes raccourcis ou rallongés, chromosomes acentriques ou multacentriques (respectivement sans centromère ou avec plusieurs centromères), et enfin, certains échanges de portions de chromosomes.

Une variante du test des aberrations chromosomiques classique permet d'établir une carte précise des translocations chromosomiques ayant eu lieu : c'est la peinture chromosomique ou « *chromosomes painting* » (Figure 15 B). Cette technique utilise des sondes spécifiques de chaque chromosome, couplées à des fluorophores différents de manière à ce que chaque chromosome métaphasique soit marqué d'une couleur différente. Il est ainsi possible d'observer et d'identifier des translocations chromosomiques si un chromosome métaphasique est marqué de différentes couleurs (Figure 15 B).

➤ Analyse des marqueurs de CDB

Les techniques abordées ci-dessus analysent exclusivement les conséquences des CDB, elles n'apportent aucune information sur la survenue de la CDB en elle-même, sa prise en charge par la cellule, ou le nombre total de CDB subies par une cellule après un traitement.

Afin de pouvoir fournir de telles informations, beaucoup de scientifiques se sont tournés vers des techniques de détection indirectes de CDB, basées sur l'immunofluorescence. Globalement, elles sont peu contraignantes et possèdent un seuil de détection des CDB extrêmement bas pour la plupart d'entre elles, mais nécessitent de fixer les cellules. En effet, elles se basent sur la détection en immunofluorescence du recrutement ou de modifications post-traductionnelles de facteurs de la voie de réponse aux CDB. Comme expliqué précédemment, certains de ces facteurs forment des foyers visibles, en microscopie, autour des CDB si bien qu'une seule CDB (correspondant à un foyer) est détectable (Rogakou *et al.*, 1999). Pour marquer ces foyers, il est possible d'utiliser des anticorps contre les marqueurs suivants : phosphoT2609-DNA-PK (pDNA-PK, Figure 16 A) (Moeller *et al.*, 2011, Azad *et al.*, 2011), MDC1 (Figure 16 B) (Lou *et al.*, 2006), phosphoS1981-ATM (pATM, Figure 16 C) (Kobayashi *et al.*, 2009), MRE11 (Figure 16 D), RAD50 (Figure 16 E)

(van Veelen *et al.*, 2005), NBS1 (Figure 16 F) (Cheng *et al.*, 2005), 53BP1 (Figure 16 F) (Ward *et al.*, 2003), γ H2AX (Figure 16 I) (Rogakou *et al.*, 1999)... γ H2AX est de loin le marqueur de CDB le plus caractérisé et le plus utilisé, notamment pour ses caractéristiques. En effet, le variant d'histone H2AX est phosphorylé quelques secondes après l'induction de la CDB (Cleaver, 2011) sur plusieurs mégabases autour du site et forme des foyers intenses, bien visibles en immunofluorescence. Cette technique permet d'évaluer la quantité de CDB subie par chaque noyau, et ce, même s'il n'y a qu'une seule CDB. De plus, la phosphorylation de γ H2AX peut être suivie par d'autres méthodes, telles que le western blot (Rogakou *et al.*, 1998) ou la cytométrie en flux (Tanaka *et al.*, 2007), même si ces méthodes sont moins sensibles.

Après réparation de la CDB, γ H2AX est déphosphorylée (Rothkamm *et al.*, 2003), notamment par les phosphatases PP2A, PP4, PP6, et WIP1 (Chowdhury *et al.*, 2005, Chowdhury *et al.*, 2008, Douglas *et al.*, 2010, Macurek *et al.*, 2010). D'autre part les formes modifiées de H2AX (γ H2AX, γ H2AX ubiquitinée et γ H2AX acétylée) se dissocieraient des nucléosomes proches du site de cassure, grâce à l'intervention de la chaperonne d'histone FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*, Heo *et al.*, 2008) et de l'histone acétyl-transférase Tip60 (Ikura *et al.*, 2007). Ces deux phénomènes combinés conduiraient à la disparition des foci γ H2AX après réparation des CDB (Soria *et al.*, 2012). La corrélation directe et quasi-immédiate des foyers γ H2AX et des CDB (Sedelnikova *et al.*, 2002) permet de refléter précisément la présence de CDB dans l'ADN à un instant donné. Cependant, étant donné que H2AX est également une cible de la kinase ATR, γ H2AX peut parfois marquer d'autres lésions ou des CDB générées indirectement (ce point est détaillé plus largement dans le chapitre II. 8) a.).

➤ Utilisation de γ H2AX en thérapies anti-cancéreuses

De par ses caractéristiques, le marquage γ H2AX est d'un intérêt certain pour le dépistage et la lutte contre le cancer. En effet, des marqueurs prédictifs de cancers sont régulièrement dosés en clinique pour diagnostiquer des tumeurs précoces ou suivre l'évolution des tumeurs : il s'agit de biomarqueurs. Ces indicateurs de tumeurs

incluent plusieurs marqueurs, comme le *CarcinoEmbryonic Antigen* (CEA), le *Prostate-Specific Antigen* (PSA), CA-19-9 pour les cancers colo-rectaux et pancréatiques, CA-15.3 pour le cancer du sein, CA6125 pour le cancer ovarien (Chatterjee *et al.*, 2005)... γ H2AX constitue quant à lui un biomarqueur potentiel intéressant :

- d'une part, pour détecter une augmentation de CDB au sein d'un tissu, ce qui peut refléter une instabilité génomique locale, comme c'est le cas dans les stades précoces d'un développement tumoral (Sedelnikova *et al.*, 2006). En effet, des niveaux de foci γ H2AX supérieurs à la normale ont pu être observés dans plusieurs cancers (cancer du côlon, du sein, de l'ovaire, du foie, du rein (Sedelnikova *et al.*, 2006)).

- d'autre part, pour estimer l'efficacité des traitements tumoraux, tels que les radiothérapies ou les traitements anticancéreux par substances générant des CDB. En effet, de nombreuses cellules tumorales sont mutées pour leurs systèmes de réparation (NHEJ, HR), ce qui contribue à leur instabilité génomique, mais qui les rend également sensibles à un taux élevé de CDB car aucune cellule ne peut continuer à proliférer sans réparer ces dommages. Par conséquent, en thérapie anti-cancéreuse, un traitement générant des CDB tue préférentiellement les cellules tumorales. Néanmoins, l'efficacité d'un tel traitement est variable d'un individu à l'autre, c'est pourquoi l'utilisation de γ H2AX comme biomarqueur de l'impact du traitement serait judicieuse. Par exemple, une forte corrélation est observée entre le nombre de foci γ H2AX dans les lymphocytes circulants de patients et l'intensité avec laquelle ils ont été irradiés (Sak *et al.*, 2010). De la même façon, il est possible d'évaluer l'efficacité d'un tel traitement sur d'autres tissus, tels la peau, la base des cheveux, la peau, les muqueuses, et bien sûr les tumeurs (Redon, 2010).

➤ Limites

Cependant, l'analyse par immunofluorescence de protéines recrutées -ou modifiées- à la CDB se heurte aux limites intrinsèques de cette technique. En effet, une étape de fixation (qui immobilise les protéines dans leur configuration) est

indispensable afin d'éviter que le contenu cellulaire soit perdu lors de la perméabilisation, nécessaire à la pénétration des anticorps dans la cellule. Par conséquent, cette technique a certes l'avantage de pouvoir détecter jusqu'à une seule CDB dans un noyau, mais elle ne renseigne sur la présence de CDB qu'à un instant précis. Il est impossible de suivre en temps réel l'apparition ou la réparation de CDB. La seule possibilité est de multiplier les échantillons pour faire varier les temps d'exposition, afin d'estimer une cinétique approximative de l'apparition de CDB. Il est par conséquent difficile de déterminer si l'effet d'un agent est de causer des dommages persistants irréparables, ou s'il cause des dommages continuels progressivement réparés. Or, connaître ces caractéristiques est crucial pour évaluer le danger d'un agent génotoxique, pour le caractériser et pour en comprendre le fonctionnement.

La création d'un outil permettant de suivre l'apparition de CDB en temps réel, qui plus est sur cellule vivante, offrirait donc de nouvelles opportunités pour l'étude des CDB et pour décortiquer l'action de génotoxiques clastogènes. C'est dans ce but que j'ai développé, au cours de ma thèse, un projet visant à établir un nouvel outil de détection des CDB en temps réel.

2) Les anticorps chaînes lourdes de camélidés

Pour créer ce biomarqueur de CDB, nous avons utilisé une technologie appelée Nanobody, inspirée des anticorps produits naturellement chez le lama.

a. Le répertoire immunitaire original des lamas

➤ Les anticorps chaînes lourdes

Les anticorps classiques de mammifères sont constitués de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L). Pourtant, les Immunoglobulines G (IgG) des espèces *camelidae* (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama*

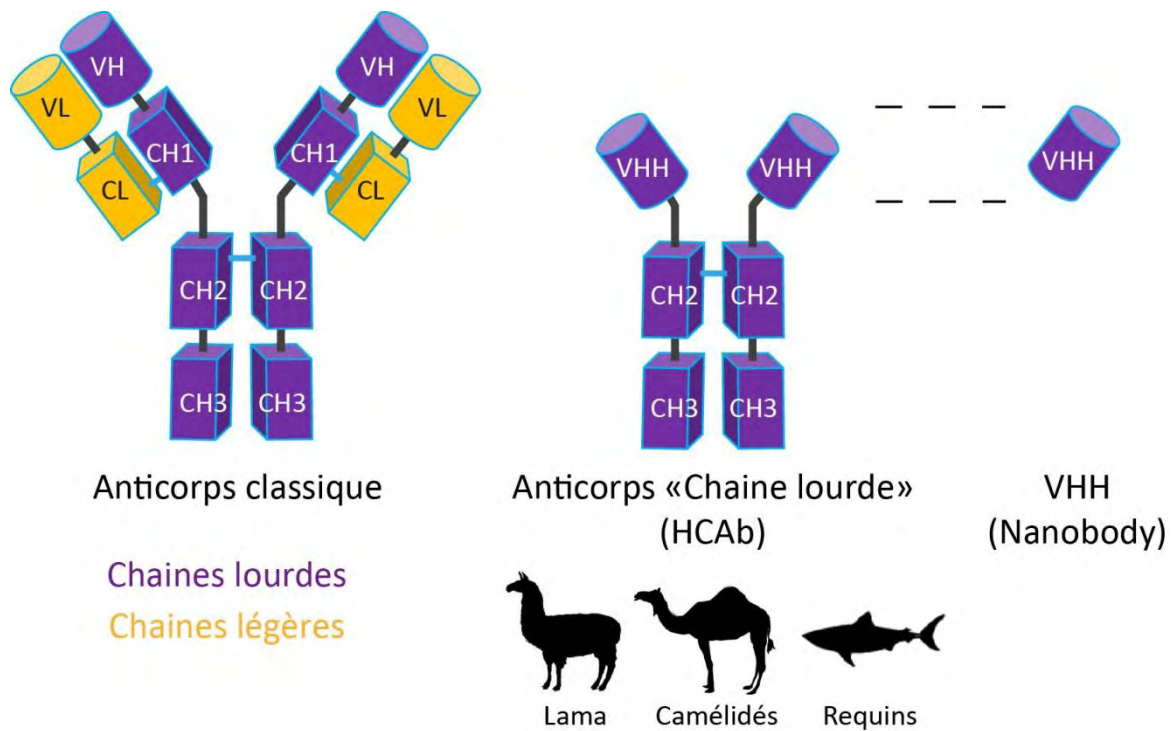


Figure 17. Différences entre anticorps conventionnels, HCab, et Nanobodies.

Les anticorps classiques (à gauche) sont constitués de deux chaînes lourdes (violet) et de deux chaînes légères (jaune). Les anticorps « chaîne lourde » (HCAb, au milieu) produits par les camélidés et certaines espèces de requins n'ont pas de chaînes légères. Contrairement aux anticorps classiques qui nécessitent les parties variables des chaînes lourdes et légères pour former un paratope fonctionnel, la partie variable de la chaîne lourde est suffisante pour la reconnaissance de l'épitope par le HCAb. Cette partie variable de HCAb peut être isolée pour former une petite particule (VHH ou Nanobody), capable de reconnaître ce même épitope.

guanoco, *Lama alpaca* et *Lama vicugna*) présentent une surprenante exception à ce paradigme, puisque leur sérum contient une importante fraction d'anticorps « chaînes lourdes » (*Heavy Chain Antibodies*, HCAb) dépourvus de chaînes légères (Figure 17, Hamers-Casterman et al., 1993). Chez les lamas, ces HCAb représentent 25-45% de la quantité totale d'anticorps. Chez les dromadaires, environ 50% des anticorps totaux sont des HCAb (Hamers-Casterman et al., 1993), et ce taux monte à 75% chez les chameaux (Nguyen et al., 1998). L'analyse par cytométrie en flux des lymphocytes circulants du chameau a démontré qu'ils possédaient une quantité plus faible de chaînes légères à la surface des lymphocytes, mais autant de chaînes lourdes, comparé aux bovins (Ungar-Waron et al., 2003). Ces données suggèrent que deux lignées de lymphocytes cohabiteraient chez le chameau, l'une sécrétant des anticorps classiques, l'autre sécrétant des anticorps chaîne lourde.

La chaîne lourde des HCAb n'est constituée que de trois domaines globulaires (CH3, CH2, VHH) au lieu de quatre pour les anticorps classiques (CH3, CH2, CH1, VHH). Les deux domaines CH2 et CH3 des HCAb sont homologues aux domaines constants des anticorps classiques tandis que le domaine CH1, responsable de l'interaction chaîne lourde - chaîne légère, est absent des HCAb (Nguyen et al., 1999, Woolven et al., 1999). Chez le dromadaire, neuf gènes pouvant coder pour des chaînes lourdes d'immunoglobulines ont été identifiés (De Genst et al., 2006). Sur ces neuf, cinq sont exprimés, car ils ont pu être clonés grâce à leur cDNA, on considère qu'ils appartiennent à plusieurs sous-classes d'immunoglobulines. De manière intéressante, 3 de ces 5 cDNA codent pour des HCAb car ils ne possèdent pas d'exon CH1, alors que cet exon est présent dans les gènes. Des analyses ont démontré qu'une mutation du site donneur d'épissage suivant l'exon CH1 conduit à l'épissage de l'exon CH1 au cours de la maturation des ARNm et génère ainsi une chaîne lourde sans domaine CH1 (Nguyen et al., 1999). Les deux ADNc restants (possédant un exon CH1) codent pour les chaînes lourdes des anticorps classiques (double-chaîne) et sont systématiquement liées aux parties variables des chaînes lourdes classiques (VH) et pas celle des HCAb (VHH) (Figure 17). Des données très similaires ont été obtenues chez le lama, même si les résultats proviennent de plusieurs espèces distinctes et qu'il faut donc les comparer avec prudence (Harmsen et al., 2000).

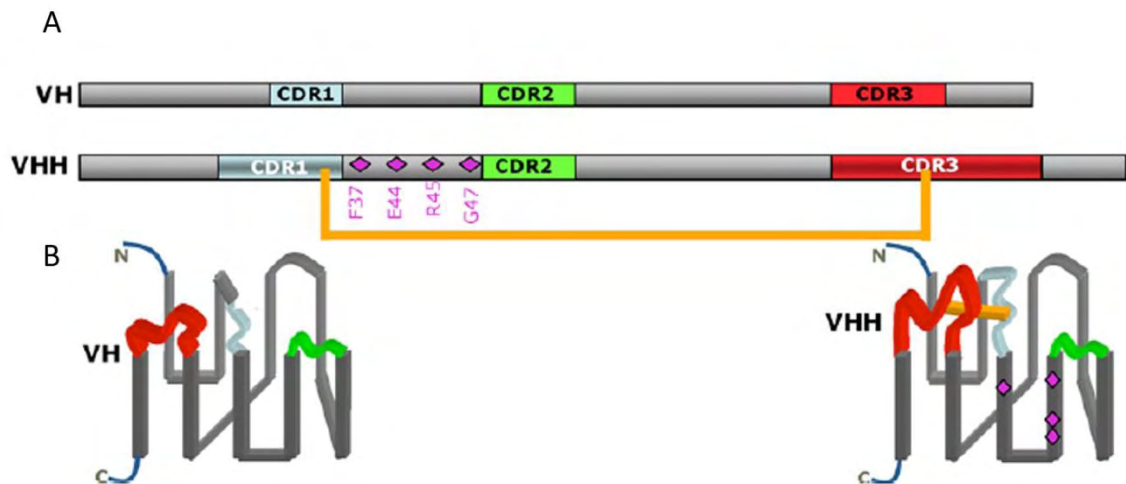


Figure 18. Comparaison des domaines VH et VHH.

A. Organisation des séquences VH et VHH avec les FR (Gris) et les trois séquences CDR (Bleu, vert et Rouge). Les substitutions caractéristiques de la FR2 d'un VHH sont représentées en violet. Le pont disulfure reliant la CDR1 à la CDR3 est représenté en jaune. B. Structure repliée simplifiée des VH et VHH. Le code couleur des CDR et FR est identique à la partie A. Les substitutions présentées en A sont représentées par des losanges violets.

Le domaine d'interaction avec l'antigène, constitué des domaines variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL), n'est réduit qu'à un seul domaine variable dans les HCAb : celui de la chaîne lourde (VHH). Pourtant, malgré l'absence de VL, le VHH est pleinement fonctionnel et reconnaît un épitope spécifique (Muyldermans *et al.*, 1994, Vu *et al.*, 1997, Harmsen *et al.*, 2000, Maass *et al.*, 2007).

Chez l'homme, une maladie dite « des chaînes lourdes » est causée par des délétions variables dans les gènes codant pour le domaine CH1 (Corcos *et al.*, 2011, Seligmann *et al.*, 1968). Il en résulte des anticorps à chaînes lourdes, qui sont non fonctionnels à cause de l'absence de chaîne légère, contrairement aux HCAb de camélidés, qui participent à la réponse immunitaire.

➤ *Fragment variable de chaîne lourde (VHH ou Nanobody)*

Les domaines variables des chaînes lourdes des anticorps classiques (VH) et ceux des HCAb (VHH) sont codés par des groupes de gènes distincts chez les dromadaires, et probablement chez les lamas également. Ces gènes partagent un fort degré d'identité de séquences et il y a une organisation remarquablement similaire entre les VH et VHH. Nonobstant, ils sont différenciables par des substitutions caractéristiques des VHH ou VH qui expliquent les capacités de liaison du VHH sous forme de simple domaine (Conrath *et al.*, 2003). Les deux domaines sont composés de quatre séquences conservées, les *Framework Régions* (FR), entourant trois régions hypervariables, les *Complementarity Determining Regions* (CDR) (Figure 18). Les expériences de cristallisation montrent que les domaines VH et VHH adoptent un repliement caractéristique des immunoglobulines de par leurs deux feuillets β (Muyldermans *et al.*, 2001, Padlan, 1994). Cette conformation oriente les trois régions hypervariables à une extrémité du domaine, connectant les feuillets β entre eux, et permettant la reconnaissance de l'antigène. L'alignement des séquences d'acides aminés de VH et VHH révèle que la première et la troisième région hypervariable du VHH sont plus longues que celles des VH (Conrath *et al.*, 2003). Par ailleurs, les CDR1 et CDR3 des VHH contiennent parfois une cystéine qui conduit à la formation d'un pont disulfure (Figure 18, bande jaune), participant au repliement des boucles CDR

(De Genst *et al.*, 2006). Une autre distinction frappante entre VH et VHH se situe dans la région FR2 : cette région est normalement hautement conservée dans les VH, et est constituée de plusieurs acides aminés hydrophobes qui servent de point d'ancrage au domaine VL. Au contraire, la région correspondante du VHH contient des résidus plus hydrophiles (Figure 18, losanges roses), ce qui explique l'absence d'association avec la VL ainsi que la solubilité du VHH.

Il n'y a pas d'explication claire à la présence de telles immunoglobulines chez les camélidés ; les autres cas où de tels anticorps simple-chaîne ont pu être observés concernent certains requins, qui produisent des HCAb appelés VNAR (*Variable domain of the shark New Antigen Receptor*) (Wesolowski *et al.*, 2009). De par l'association des CDR des VL et VH, on pourrait s'attendre à ce que le paratope des anticorps classiques soit beaucoup plus grand que celui des VHH. Pourtant, le paratope des VHH est étendu grâce à l'extension de la boucle CDR1 et parfois de la CDR3 (Nguyen *et al.*, 2001, Vu *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'essentiel de la diversité paratopique des anticorps classiques vient des combinaisons d'associations VL-VH, évidemment absentes chez les VHH. Cette limitation du répertoire paratopique est compensée par la flexibilité des boucles CDR, capables d'adopter des conformations diverses, jamais observées dans les VH d'humains ou de souris (Decanniere *et al.*, 2000). Ainsi, on suppose que ces caractéristiques propres aux VHH permettraient aux HCAb d'atteindre des épitopes inaccessibles pour les anticorps conventionnels et ainsi d'étendre le spectre du répertoire immunitaire de ces animaux (Muyldermans, 2001). Cette hypothèse est renforcée par l'étude comparative de l'interaction d'un nanobody et d'un anticorps classique avec sa cible (lysozyme), par cristallographie (Wesolowski *et al.*, 2009). Grâce à ses boucles CDR plus longues, le nanobody peut effectivement accéder au site catalytique du lysozyme, alors que l'anticorps classique n'a accès qu'aux épitopes externes.

b. Nanobodies/VHH, des anticorps miniaturisés

Clonés en bactérie, les VHH de lama peuvent alors s'exprimer sous forme d'entités strictement monomériques capables de lier spécifiquement un antigène (Muyldermans *et al.*, 1999). Ces particules ne font que 14-15 kDa, de la forme d'un petit ballon de rugby de 4 x 2,5 x 3nm de dimension, soit au moins 10 fois plus petit que la taille d'un anticorps classique. La notoriété croissante, ainsi que la taille nanométrique de ces VHH ont poussé la société Ablynx (société se concentrant sur les applications thérapeutiques des anticorps de lama) à renommer les VHH en *Nanobodies*®.

Les nanobodies ont peu ou pas de modifications post-traductionnelle et sont spontanément peu toxiques. Ils peuvent donc être produits dans beaucoup d'organismes très différents et à des taux élevés : bactéries (Pellis *et al.*, 2012, Pollithy *et al.*, 2011a), levures (Frenken *et al.*, 2000, Harmsen *et al.*, 2007), plantes (Teh *et al.*, 2010, Schornack *et al.*, 2009), drosophile (Caussinus *et al.*, 2011) ou encore dans les souris ou les cellules humaines (Rothbauer *et al.*, 2006).

Par ailleurs, plusieurs équipes ont démontré que les nanobodies conservent leur stabilité dans des environnements parfois extrêmes, comme des températures supérieures à 70°C (Goldman *et al.*, 2006, Ladenson *et al.*, 2006) ou d'autres conditions très dénaturantes comme de fortes concentrations d'acide chlorhydrique, d'urée (Dolk *et al.*, 2005), ou dans la lumière intestinale (Harmsen *et al.*, 2006, Winichayakul *et al.*, 2009, Harmsen *et al.*, 2007).

c. Nanobodies : un outil multifonctions prometteur

Ces propriétés ont conduit les scientifiques à développer des nanobodies pour des applications extrêmement diverses et originales. En recherche médicale, des équipes ont repris l'ancien principe de l'immunothérapie anticancéreuse en remplaçant l'anticorps monoclonal classique ciblant la tumeur par un nanobody (Rahbarizadeh *et al.*, 2011), et ont obtenu des résultats très prometteurs. Des procédés à base de nanobodies sont également en cours d'élaboration pour lutter

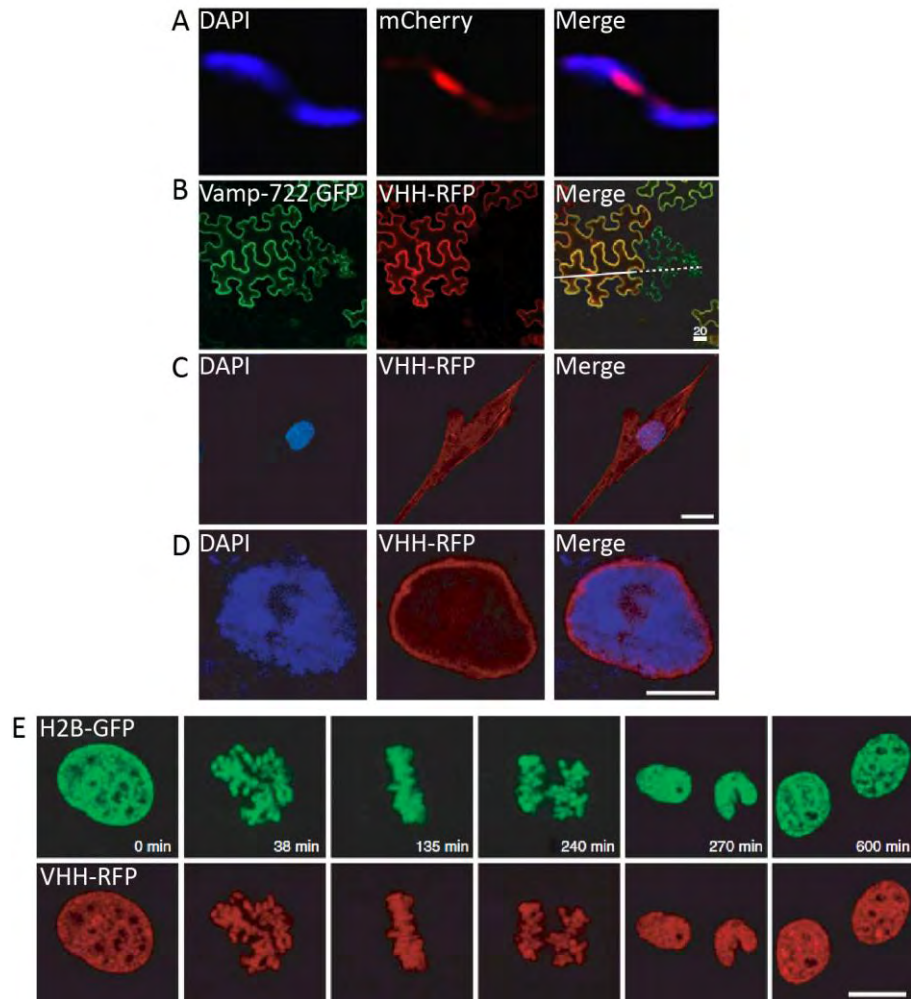


Figure 19. Utilisation des nanobodies pour traquer des protéines intracellulaires (intrabodies).

Les nanobodies constituent des intrabodies fonctionnant dans plusieurs modèles vivants. A. Magnetobactérie (*Magnetospirillum gryphiswaldense*) exprimant un nanobody dirigé contre la mCherry et ancré à un magnétosome (organite). Cette image montre que, co-exprimé à la mCherry (rouge), le nanobody est capable de séquestrer la mCherry au magnétosome (Pollithy *et al.*, 2011a). B. Co-expression de la protéine membranaire VAMP722 fusionnée à la GFP et d'un nanobody fusionné à la RFP (nanobody-RFP) anti-GFP dans la plante *Nicotiana benthamiana*. Ces résultats montrent la capacité du VHH à se relocaliser au niveau de la membrane grâce à son affinité pour la GFP fusionnée à VAMP-722 (Schornack *et al.*, 2009). C. Expression d'un nanobody-RFP anti-Cytokeratine 8 (protéine des filaments intermédiaires) dans ces cellules de myoblastes murines. L'intrabody est relocalisé aux filaments intermédiaires (Rothbauer *et al.*, 2006). D. Expression d'un nanobody-RFP anti-lamine (protéine de la membrane nucléaire) dans des cellules S2 de *Drosophila melanogaster*. Le nanobody est relocalisé à la membrane nucléaire (Rothbauer *et al.*, 2006). E. Suivi en temps réel d'un nanobody-RFP anti-GFP et d'une H2B-GFP (Histone 2B) au cours de la mitose, en cellules HeLa (Rothbauer *et al.*, 2006).

contre des maladies autoimmunes, en diminuant les immunoglobulines autoréactives du sang des patients grâce à des nanobodies anti IgG (Klooster *et al.*, 2007). L'utilisation de nanobodies contre des maladies neurodégénératives (Gueorguieva *et al.*, 2006) semble intéressante, et plus particulièrement la maladie d'Alzheimer (Lafaye *et al.*, 2009). En effet, certains nanobodies sont capables de reconnaître des oligomères A β (responsables de la maladie) et d'empêcher leur neurotoxicité.

Utiliser des nanobodies pour lutter contre des d'autres pathologies a également été évoqué : en prophylaxie ou thérapie antivirale (Garaicoechea *et al.*, 2008, Serruys *et al.*, 2010), puisque des nanobodies dirigés contre la protéine de capsid conservée VP6 du rotavirus confèrent une protection partielle au virus en modèle murin. Egalement, les nanobodies ont été proposés pour lutter contre des bactéries (Krüger *et al.*, 2006) : des nanobodies fusionnés à une enzyme bactéricide et dirigés contre une souche de *Streptococcus mutans* ont permis de réduire sa colonisation chez la souris. Des nanobodies « antiparasitaire » pour cibler et lutter contre le trypanosome (Stijlemans, 2003) ont été développés. Des propriétés antitoxines ont été attribuées à des nanobodies capables de neutraliser la toxine de scorpion chez la souris (Meddeb-Mouelhi *et al.*, 2003, Hmila *et al.*, 2008). Certains nanobodies aux vertus anti-thrombotiques ou anti-inflammatoires, développés par Ablynx, sont même en étude clinique de phase II (www.ablynx.com).

Les applications des nanobodies ne se limitent pas au domaine médical, puisqu'ils peuvent être utilisés comme outils pour doser ou capturer diverses substances ou protéines dans des mélanges : caféine (Ladenson *et al.*, 2006), antigène prostatique (Huang *et al.*, 2005), Green ou Red Fluorescent Protein (RFP ou GFP) (Zolghadr *et al.*, 2008, Pollithy *et al.*, 2011b), toxines (Hofmann *et al.*, 2010)... Une des applications les plus surprenantes concerne l'utilisation d'un nanobody pour lutter contre un champignon, *Malassezia furfur*, directement dans un shampoing antipelliculaire (Dolk *et al.*, 2005) !

Enfin, les nanobodies sont également utilisés en recherche fondamentale en tant qu'intrabodies. Ils sont exprimés de façon intracellulaire notamment pour traquer ou piéger des protéines *in cellulo* (Figure 19, Rothbauer *et al.*, 2006).

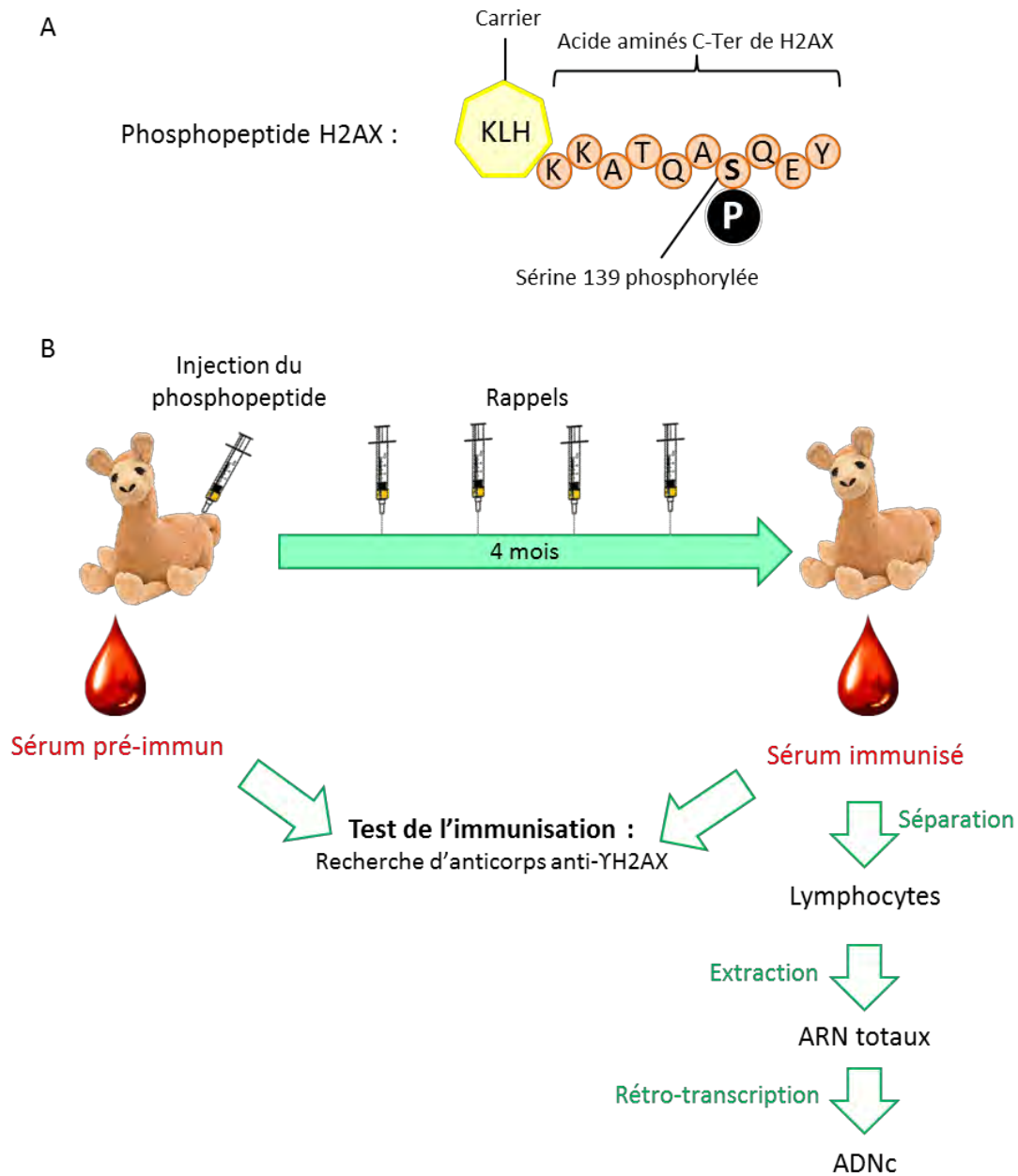


Figure 20. Protocole d'immunisation du lama avec le phosphopeptide H2AX.

A. Représentation schématique de l'antigène utilisé pour l'immunisation. Les 10 derniers acides aminés C-Terminaux de H2AX sont couplés en N-Terminal avec un carrier KLH. La sérine 7 (correspondant à la sérine 139 de la protéine H2AX originale) est phosphorylée. B. Déroulement de l'immunisation. Le lama (nom : Dalai) a subi 5 injections de phosphopeptide, mélangé alternativement avec de l'adjuvant Freund complet ou incomplet pendant 4 mois (voir procédures expérimentales). Du sang est prélevé avant (sérum pré-immun) et après (sérum-immunisé) l'immunisation pour évaluer la présence d'anticorps anti- γ H2AX dans le sérum (Figure 21). 500 mL de sang sont prélevés après immunisation pour en isoler les lymphocytes, grâce à une séparation par gradient (voir procédures expérimentales). Les lymphocytes sont lysés et les ARN totaux sont purifiés pour être rétro-transcrits en ADNc (Figure 22).

d. Des nanobodies suivant les cassures double-brin en temps réel

Notre objectif est d'utiliser les nanobodies afin de créer une lignée cellulaire détectant les CDB de l'ADN en temps réel. Nous souhaitons faire exprimer dans la cellule des nanobodies dirigés contre γ H2AX, qui devront donc être relocalisés en temps réel au niveau des CDB.

3) Résultats : Obtention de HCAb anti- γ H2AX

Obtenir des nanobodies spécifiques de la phosphorylation de H2AX est crucial pour la réussite du projet. Pour optimiser nos chances de détecter de tels nanobodies, il est préférable de partir d'un répertoire immunitaire ayant produit des HCAb contre γ H2AX, plutôt que d'un répertoire naïf. Pour cette raison, nous avons procédé à l'immunisation d'un *Lama alpaca* (Nom : Dalai) contre un peptide H2AX phosphorylé : ce peptide, généré par synthèse biochimique (Eurogentech), est constitué des 10 derniers acides aminés contenant la serine 139 de H2AX et est phosphorylé sur cette sérine (Figure 20 A). De plus, ce peptide est conjugué à une protéine *carrier* KLH, rendant ce complexe plus immunogène pour favoriser la production d'anticorps contre cette cible. Lors de la première injection, le phosphopeptide est mélangé avec un adjuvant de Freund complet, qui stimule la réponse immunitaire grâce à des particules de *Mycobacterium tuberculosis* inactivées (Figure 20 B). Cette injection est suivie de 4 rappels répartis sur 4 mois, où le phosphopeptide est injecté alternativement avec du Freund complet ou incomplet (sans particules mycobactérienne). Les injections répétées sont censées produire une réactivation régulière du système immunitaire et donc une hypermutation somatique. Cette hypermutation enrichit le système immunitaire du lama en anticorps spécifiques de γ H2AX, mais avec des séquences, et donc des comportements et affinités plus variés. L'adjuvant de Freund complet étant un stimulant puissant du système immunitaire, l'alternance avec le Freund incomplet (dépourvu de *M. tuberculosis* inactivé) permet d'éviter une sur-réaction du système immunitaire, délétère pour la santé du lama.

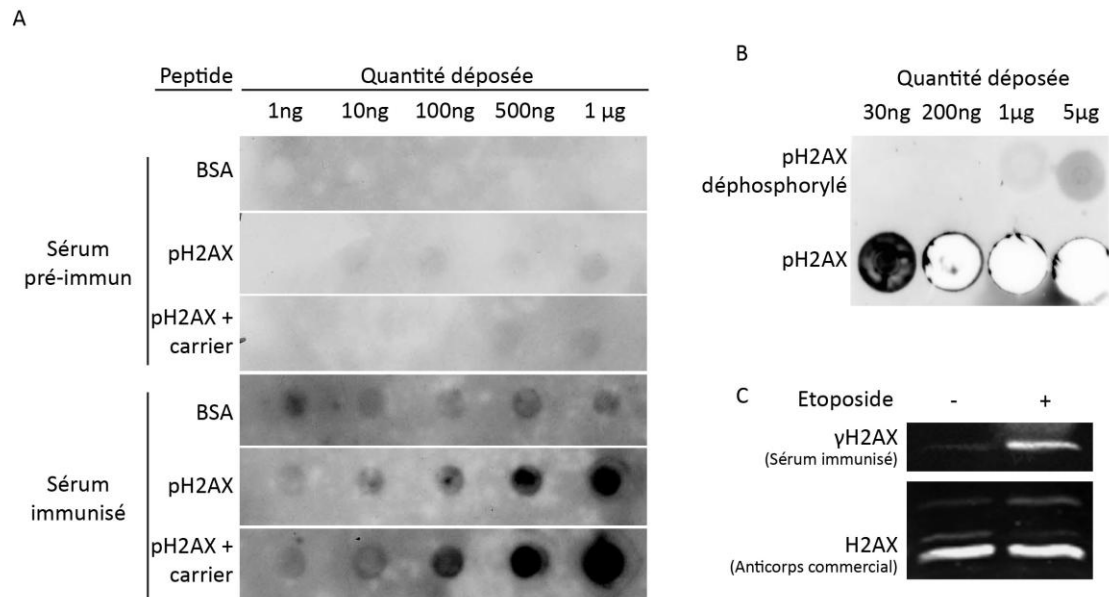


Figure 21. Evaluation de l'efficacité de l'immunisation contre le phosphopeptide H2AX.

A. Dot Blot anti phosphopeptides. Des quantités croissantes de BSA ou de phosphopeptides H2AX (pH2AX) avec ou sans carrier ont été déposées sur membrane. Le sérum du lama pré-immun ou immunisé est incubé avec ces membranes et la présence d'anticorps de lama retenus est détectée par des anticorps secondaires anti-lama. B. Des quantités croissantes de phosphopeptide H2AX (pH2AX), déphosphorylé ou non *in vitro*, ont été déposées sur membrane puis révélées par le sérum de lama immunisé (comme A). Le signal blanc obtenu sur les 3 derniers puits (en bas à droite) est le reflet d'un signal saturant trop intense (supérieur au puits en bas à gauche). C. Des cellules HeLa sont traitées ou non à l'etoposide (25µM, 1 h). Les extraits protéiques sont révélés par western blot avec le sérum du lama immunisé. Un contrôle de dépôt est réalisé avec un anticorps commercial anti-H2AX.

Afin de déterminer l'efficacité de l'immunisation, la présence d'anticorps anti-phosphopeptide H2AX est évaluée par dot-blot (Figure 21 A). Différentes doses de peptides sont déposées sur membrane de nitrocellulose et incubées avec le sérum du lama avant ou après immunisation. La fixation d'anticorps de lama sur la membrane est révélée par un anticorps secondaire anti-lama. Avant l'immunisation, aucune réponse immunitaire contre le phosphopeptide H2AX ou le carrier n'est observée. Après immunisation, des anticorps contre le complexe carrier/phosphopeptide H2AX, mais également contre le phosphopeptide H2AX seul, sont détectables, signe que l'immunisation a été efficace. Par ailleurs, la contribution de Julien Vignard a permis de mieux analyser cette réponse immunitaire. En effet, le sérum immunisé montre une réponse plus forte contre le phosphopeptide H2AX que contre le peptide déphosphorylé (Figure 21 B). Le signal blanc (pour les doses 200 ng, 1 µg, 5 µg) est le reflet d'un signal très fort (saturant), et donc d'une réponse immunitaire importante contre le phosphopeptide H2AX. Afin de déterminer si les anticorps produits par le lama sont capables de reconnaître spécifiquement la protéine sauvage γ H2AX, le sérum immunisé est utilisé pour révéler la phosphorylation de la protéine endogène. Des cellules HeLa sont exposées ou non à 25 µM d'etoposide (1 h) et l'extrait protéique est analysé en western blot (Figure 21 C). Comme précédemment, le sérum immunisé est utilisé comme anticorps primaire et révélé par un anticorps secondaire anti-lama. Un signal positif est détecté pour les extraits issus de cellules traitées à l'etoposide (Figure 21 C). Par conséquent, l'immunisation du lama a bien provoqué une réponse immunitaire efficace contre le phosphopeptide H2AX obtenu par synthèse biochimique, mais également contre la cible γ H2AX issue d'un contexte cellulaire.

4) Création d'une banque de VHH

Afin de faire exprimer des VHH anti- γ H2AX en cellule humaine, il est nécessaire d'obtenir les séquences codantes de ces VHH. Elles sont présentes dans les lymphocytes de lama immunisé, qui produisent les HCAb. Nous souhaitons donc obtenir un maximum de ces séquences, afin d'assurer la meilleure diversité, et les cloner pour créer une banque de séquences VHH. Ainsi, préserver cette diversité au

cours des étapes de création de la banque donne de meilleures chances d'isoler des séquences codant pour des VHH spécifiques de γ H2AX. Tout au long de la création de la banque, il est primordial de conserver un maximum de séquences et d'éviter la perte de séquences VHH intéressantes. Par conséquent, chaque étape de la création de la banque a nécessité une mise au point fine afin d'obtenir le meilleur rendement possible. Nous nous sommes d'ailleurs inspiré protocole expérimental établi par A. Olichon (Olichon *et al.*, 2012), qui a déjà construit des banques de nanobodies. Lors de ces mises au point (expliquées ci-après), nous avons également fait varier de nombreux facteurs que nous n'évoquerons plus dans les résultats :

- pour les PCR : tests de tampons, d'enzymes polymérases, de températures de réaction (en particulier hybridation et élongation), de quantités d'amorces.

- pour les digestions des produits de PCR : tests de temps d'incubation, tests de la quantité d'enzymes, de leur ratio et des tampons de digestion (en particulier pour les double-digestions enzymatiques).

- pour l'étape de ligation : tests des températures et des temps d'incubation, de la quantité d'enzyme et du tampon de ligation.

- pour l'étape de transformation : tests de bactéries électrocompétentes (après différentes méthodes de préparation), tests des modalités de transformation (par choc thermique ou par électroporation), tests de la quantité d'ADN ligé utilisée pour chaque électroporation.

Dans les procédures expérimentales, seules sont détaillées les conditions ayant produit le meilleur rendement à chaque étape.

a. Obtention des ADNc des VHH

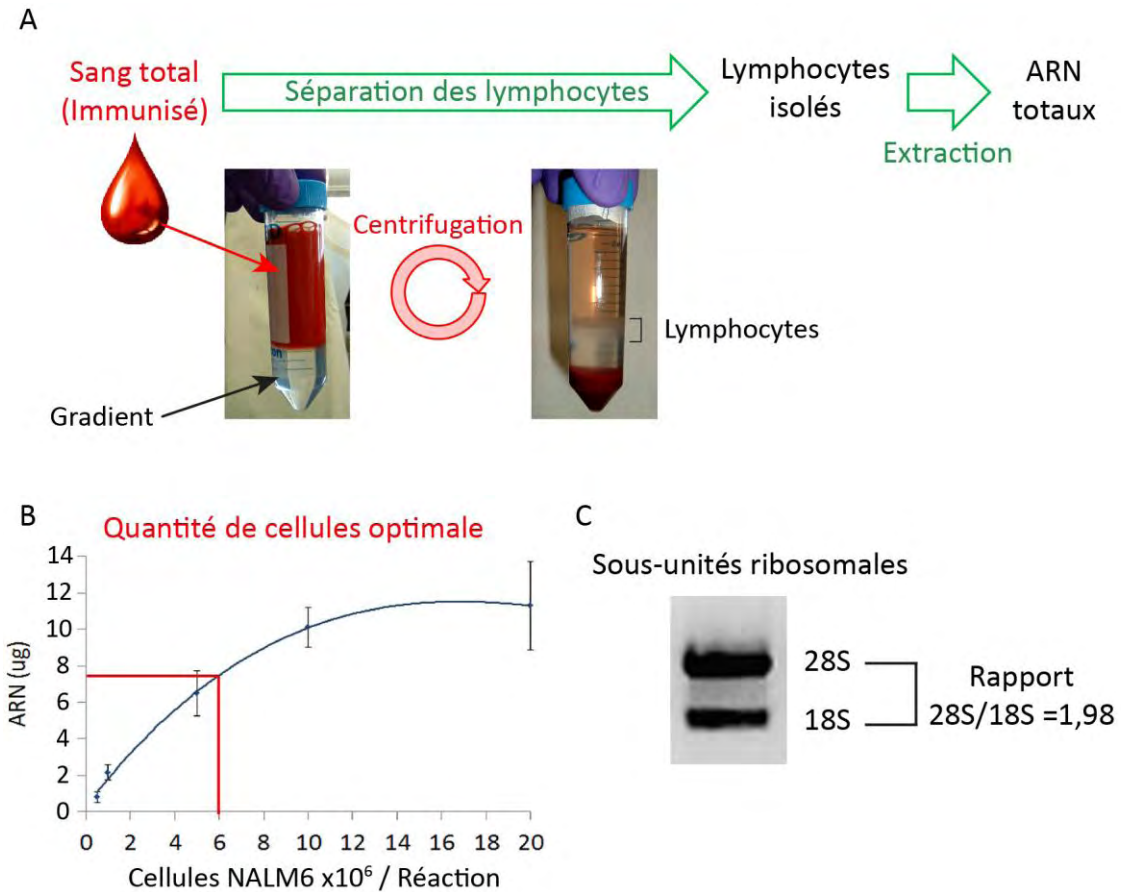


Figure 22. Mise au point de l'extraction d'ARN totaux à partir de lymphocytes isolés.

A. Représentation schématique de l'isolation des lymphocytes à partir du sang total. Les 500 mL de sang total prélevés après immunisation sont mélangés avec un gradient de polysucrose et centrifugés. Les différentes cellules du sang sont séparées selon leur densité et les lymphocytes se retrouvent dans un anneau blanc, qui est prélevé. Les lymphocytes sont lysés pour en extraire les ARN totaux. B. Détermination de la quantité optimale de lymphocytes pour obtenir le rendement optimal d'ARN par extraction. Des quantités croissantes de cellules NALM6 (lignée en culture) sont lysées et leurs ARN totaux sont extraits et quantifiés. C. Evaluation de la qualité de l'ARN extrait. Les ARN totaux extraits sont séparés sur gel d'agarose et le rapport d'intensité de la sous-unité 28S / sous-unité 18S est quantifié.

➤ *Extraction des ARN totaux*

Les séquences codant pour les VHH sont obtenues à partir des ARN messagers (ARNm) contenus dans les lymphocytes du lama, prélevés après immunisation. Par conséquent, au terme de l'immunisation, environ 5.10^8 lymphocytes ont été isolés à partir de 500mL de sang du lama, grâce à un gradient de polysucrose (Figure 22 A). De ces lymphocytes isolés sont extraits les ARN totaux (comprenant les ARNm codant pour les VHH). Afin d'obtenir la meilleure qualité possible d'ARN totaux lors de cette extraction, nous avons choisi d'utiliser un kit d'extraction d'ARN (RNeasy, Qiagen). La quantité d'ARN extraits par réaction du kit étant limitée, j'ai réalisé des tests à partir d'une lignée lymphocytaire (NALM6) pour déterminer les conditions permettant à la fois une bonne conservation des ARN lors de l'extraction, mais également le maximum de cellules dont on pouvait extraire l'ARN par réaction d'extraction sur minicolonne.

Il est impossible d'extraire en une fois les ARN totaux d'un nombre de cellules trop élevé, mais un nombre trop faible de cellules par réaction ferait utiliser trop de réactions. Ainsi, différentes quantités de cellules NALM6 par réaction ont été utilisées pour estimer le nombre optimal de cellules par réaction (Figure 22 B) et évaluer les limites des minicolonnes en termes d'extraction d'ARN. On observe qu'au-delà de 10 millions de cellules NALM6 par réaction, la quantité d'ARN extraite n'est plus proportionnelle au nombre de cellules utilisées et que la membrane fixant les acides nucléiques est saturée. Afin de nous situer en dessous de ce seuil de saturation, nous avons utilisé 6 millions de cellules par réaction, condition pour laquelle la quantité d'ARN totaux extraite est proportionnelle au nombre de cellules utilisées (Figure 22 B).

La dégradation des sous-unités ribosomales 28S et 18S est un témoin de l'état général de l'ARN extrait ; on peut estimer la quantité relative de ces deux sous-unités en faisant migrer les ARN totaux en gel d'agarose. Si l'extraction est correcte, on obtient environ deux fois plus de sous-unité 28S que de sous-unité 18S. En revanche, dans le cas d'une mauvaise extraction, la sous-unité 18S se dégrade plus rapidement que la 28S et le rapport de quantité 28S/18S devient très supérieur à 2. Les ARN totaux extraits des NALM6 possèdent un rapport 28S/18S d'environ **1,98** (Figure 22 C). L'extraction d'ARN est donc optimale pour les lymphocytes du lama. Dans ces

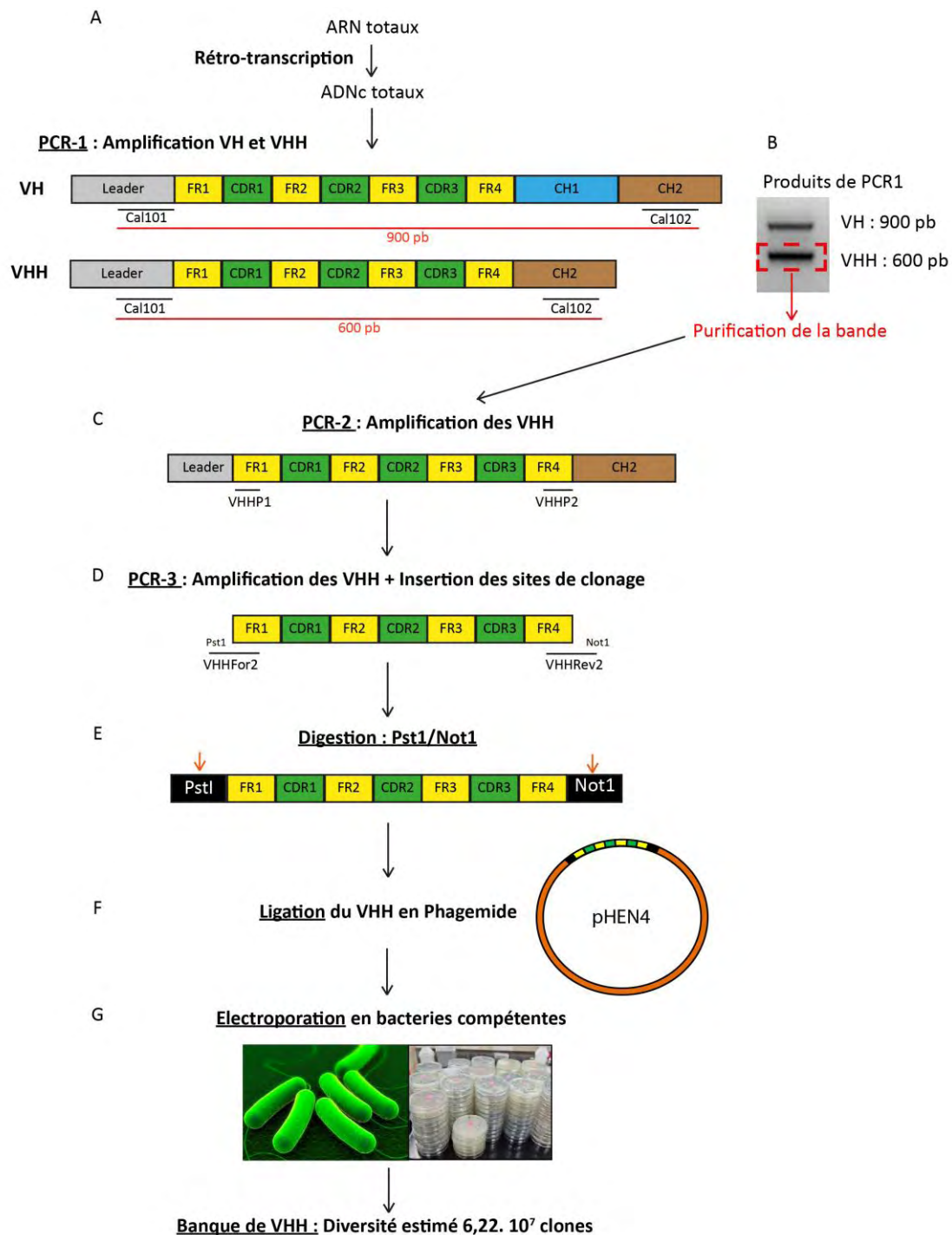


Figure 23. Création de la banque de VHH.

A. Les ARN totaux extraits des lymphocytes sont rétro-transcrits en ADNc. La PCR-1 est effectuée sur ces ADNc pour amplifier les VH et VHH. Le produit d'amplification de la PCR-1 est de 900 pb s'il s'agit de la séquence VH, et de 600 pb s'il s'agit de la séquence VHH. B. Les deux produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose, et la bande de 600 pb correspondant à la séquence du VHH est purifiée sur gel. C et D. Effectuées sur la PCR-1 purifiée sur gel, les PCR nichées 2 et 3 amplifient les VHH et permettent l'insertion des sites de restriction PstI et NotI, nécessaires au clonage. E. Digestion des produits de PCR-3 par PstI et NotI. F. Ligation des séquences VHH digérées en vecteur phagemide pHEN4. G. Electroporation des produits de ligation VHH/pHEN4 en bactéries TG1. Obtention d'une banque bactérienne de séquences VHH.

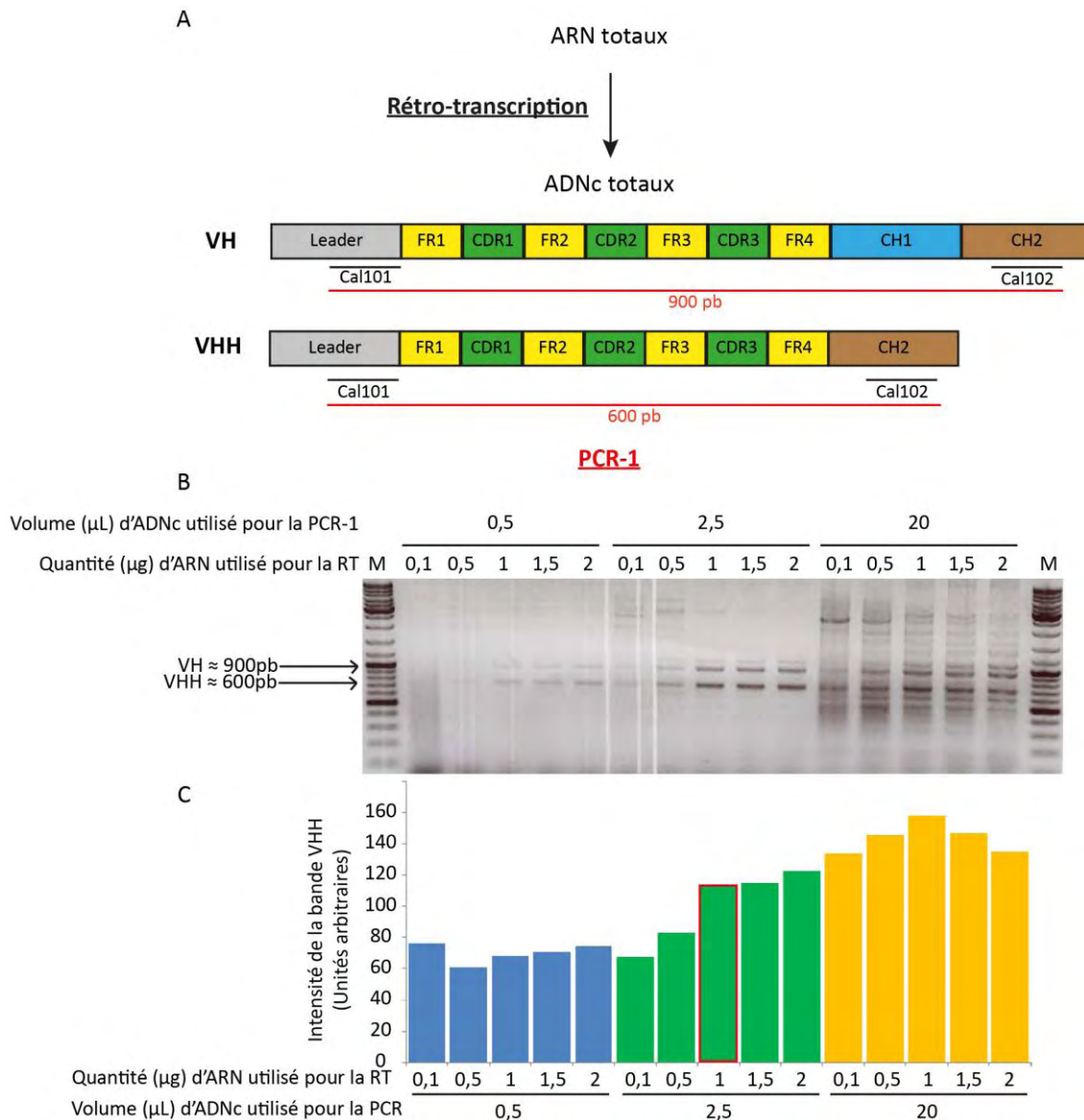
conditions, 83 extractions ont été nécessaires pour obtenir la totalité des ARN des lymphocytes purifiés du lama, soit environ 450 µg d'ARN.

➤ *Retro-transcription des ARN en ADNc et amplification (PCR-1)*

Afin d'obtenir les ADNc, les ARN sont rétro-transcrits par *random priming* en ADNc. Cette rétro-transcription est suivie de la PCR-1, qui a pour but d'amplifier les séquences spécifiques aux immunoglobulines. Il n'est pas idéal d'amplifier directement les séquences codant pour les VHH par RT-PCR, au risque d'amplifier également les séquences codant pour les VH des anticorps classiques (Figure 23 A). En effet, les séquences *Framework Region* (FR) flanquant les séquences CDR étant très similaires entre VH et VHH, il est impossible de créer des amorces s'hybridant spécifiquement avec les séquences FR du VHH uniquement. Cette PCR conduirait à des produits d'amplification de VH et de VHH de taille identique et donc non distinguables. Or, seuls les VHH sont utilisables en tant que nanobodies.

Afin de séparer les ADNc des VH et des VHH, les amorces de la PCR-1 ciblent des régions conservées des HCAb et des anticorps classiques, dont la région CH2 et la séquence leader. Les VHH étant caractérisés par l'absence du domaine CH1 suite à un épissage alternatif, les produits d'amplifications de PCR-1 des VH et VHH sont de tailles différentes : les VH donnent des produits d'amplification d'environ 900 pb tandis que les VHH génèrent un produit d'environ 600 pb, ce qui permet de les isoler et de les purifier après migration sur un gel d'agarose (Figure 23 B).

Toujours dans un souci de préserver la diversité de la future banque, une très faible quantité d'ARN totaux est utilisée pour optimiser la réaction de PCR-1. Pour cela, nous avons d'abord fait varier la quantité d'ARN par réaction de rétro-transcription (0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg ou 2 µg). Mais également, nous avons utilisé différents volume de produit de rétro-transcription (ADNc) comme matrice pour la PCR-1 (0,5 µL, 2,5 µL ou 20 µL). Afin de déterminer les meilleures conditions, nous comparons les intensités des bandes correspondant aux produits de PCR-1, en particulier la bande correspondant au VHH (Figure 24).

**Figure 24.** Mise au point de la PCR-1.

A. Schéma de la rétro-transcription des ARN totaux et de la PCR-1. B. Des quantités croissantes d'ARN totaux sont utilisées pour la rétro-transcription (RT) en ADNc. B. Différents volumes de ces produits de rétro-transcription sont utilisés en PCR-1 afin de déterminer les conditions fournissant le meilleur rendement d'ADN. B. Les produits de PCR-1 sont séparés sur gel d'agarose. Les produits correspondant à l'amplification des séquences VH (900 pb) et VHH (600 pb) sont indiqués par des flèches. M : marqueur de poids moléculaires. C. Quantification de l'intensité des bandes VHH en fonction des conditions. La colonne encadrée de rouge représente les conditions optimales choisies pour amplifier toutes les séquences par PCR-1.

Nous observons qu'un volume trop faible d'ADNc ($<0,5\mu\text{L}$) ne produit pas de bandes aspécifiques et des bandes VH et VHH de trop faible intensité (Figure 24 B et C, colonnes de gauche du gel et partie bleue du graphe). Amplifier par PCR-1 les produits ADNc dans ces conditions demanderait donc trop de réactions pour un rendement trop faible. En revanche, un trop grand volume d'ADNc ($>20\mu\text{L}$) conduit à l'apparition de bandes non spécifiques (Figure 24 B et C, colonnes de droites du gel et partie jaune du graph). De plus, alors que le volume d'ADNc est 8 fois plus important que la condition utilisant $2,5\mu\text{L}$ d'ADNc, l'intensité de la bande VHH n'est multipliée en moyenne que par $\approx 1,4$ (colonnes jaunes). L'augmentation n'est donc pas proportionnelle, suggérant que réaliser la PCR-1 dans ces conditions conduirait à des pertes de séquences. Pour ces deux raisons, cette condition a également été écartée.

Enfin, la condition utilisant $2,5\mu\text{L}$ d'ADNc (Figure 24, colonnes centrales et partie du graphe en vert) génère des produits VHH sans bandes parasites et d'une intensité supérieure à la condition $<0,5\mu\text{L}$ d'ADNc. La quantité optimale d'ARN à utiliser dans cette condition semble être $1\mu\text{g}$ (colonne verte encadrée de rouge), car au-delà (pour $1,5$ ou $2\mu\text{g}$ d'ARN), l'intensité de la bande VHH augmente peu. Nous estimons donc que la condition « $1\mu\text{g}$ d'ARN et $2,5\mu\text{L}$ d'ADNc » est la plus efficace pour rétro-transcrire les ARN en ADNc et amplifier les VH et VHH lors de la PCR-1.

Parce que le nombre de réactions de rétro-transcriptions est limité, et au cas où la rétro-transcription de tous les ARN serait un échec, nous avons conservé 75% des ARN totaux que nous n'avons pas rétro-transcrit. Ce choix divise par 4 la diversité de la banque, mais il s'agit d'un risque mesuré puisque nous supposons que dans le lama, chaque lymphocyte stimulé par les boosts s'est multiplié et est représenté plus de 4 fois. Par conséquent, environ 112 réactions ont été nécessaires pour rétro-transcrire les $112,5\mu\text{g}$ d'ARN (25% du total), soit 896 réactions de PCR-1 et de purifications sur gel pour amplifier toutes les séquences codantes des VH et VHH à partir de ces ADNc.

Toutes les réactions sont faites dans des mix séparés : en effet, au cas où l'une des séquences s'amplifierait plus rapidement que les autres (de par sa taille ou sa composition en nucléotides), celle-ci pourrait rapidement devenir majoritaire en quelques cycles de PCR-1, ce qui serait dramatique. Par ailleurs, le nombre de cycles de PCR est limité à 22 pour éviter ce problème et, également, de ne pas perdre les

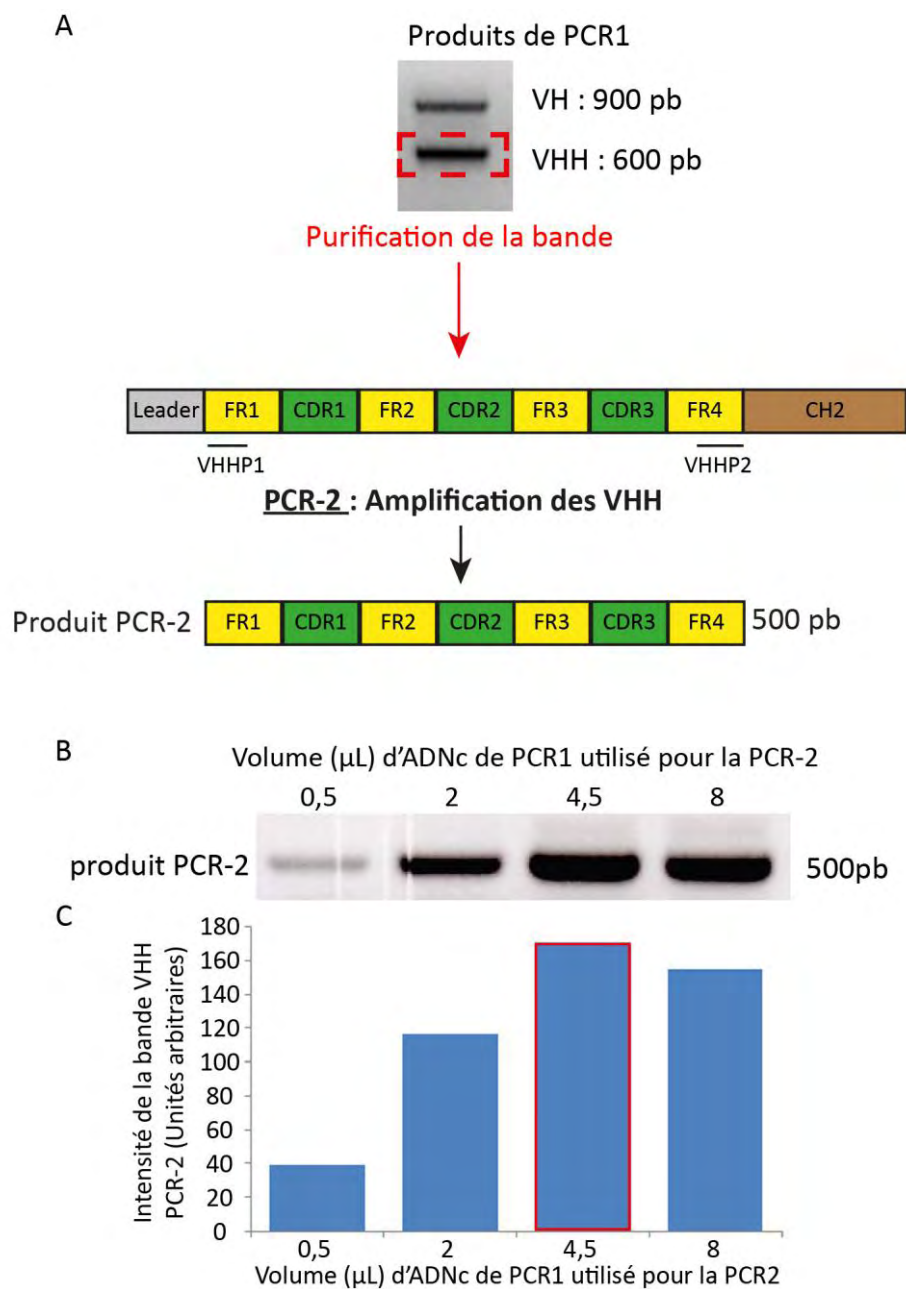


Figure 25. Mise au point de la PCR-2.

A. Schéma de la purification des produits de PCR-1 et amplification par PCR-2. Les produits de PCR-1 sont séparés sur gel et la bande à 600 pb (correspondant à la séquence des VHH) est purifiée sur gel. Cet ADN purifié est amplifié par PCR-2. B. Différents volumes de PCR-1 sont utilisés comme matrice pour la PCR-2. Les produits de PCR-2 sont séparés en gel d'agarose pour évaluer l'efficacité de la PCR-2. C. L'intensité des bandes à 500pb est quantifiée. La colonne encadrée de rouge représente les conditions optimales choisies pour amplifier toutes les séquences par PCR-2.

séquences copiées plus lentement lors des étapes de PCR (pour des raisons diverses telles que la présence de séquences de nucléotides répétés par exemple, de structures secondaires du produit de PCR...).

➤ *Obtention des séquences codantes de VHH (PCR-2 et 3)*

Afin d'obtenir les séquences codantes des VHH, l'intégralité des 896 produits de PCR-1 sont séparés sur gel d'agarose, et les bandes correspondant aux VHH (600 pb) sont purifiées (Figure 25 B). On estime que lors des 22 cycles de PCR-1, les séquences VHH ont été amplifiées largement plus de 10 fois, nous permettant d'utiliser uniquement 20% des produits de purification pour la suite sans risquer d'affecter la diversité de la banque. Le surplus de purification de PCR-1 est conservé en cas d'échec ultérieur.

Ces séquences codantes de VHH sont ensuite amplifiées par 2 PCR nichées, qui ont pour but d'amplifier légèrement les VHH, tout en maintenant leur diversité, et d'insérer les sites de restriction nécessaires au clonage de la banque (PCR-2 et PCR-3 ; Figure 23 C et 23 D).

La PCR-2 utilise des amorces s'hybridant dans les régions constantes des *Framework Regions* (FR) au cours de seulement 8 cycles, pour obtenir une amplification relative des séquences de VHH. Ce nombre de cycles réduit a pour but de limiter la suramplification de certains clones au détriment d'autres (Figure 25 C). Là encore, différents volumes de PCR-1 sont testés afin d'avoir le meilleur produit d'amplification en PCR-2. On observe qu'au-delà de 4,5µL de produit PCR-1, la réaction est saturée, n'amplifiant plus de façon proportionnelle les séquences VHH. Nous appliquons donc, pour la PCR2, une condition utilisant 4,5µL de PCR-1. Pour les mêmes raisons que précédemment, les réactions sont effectuées dans des mix séparés, ce qui totalise 896 PCR-2 pour amplifier toutes les séquences.

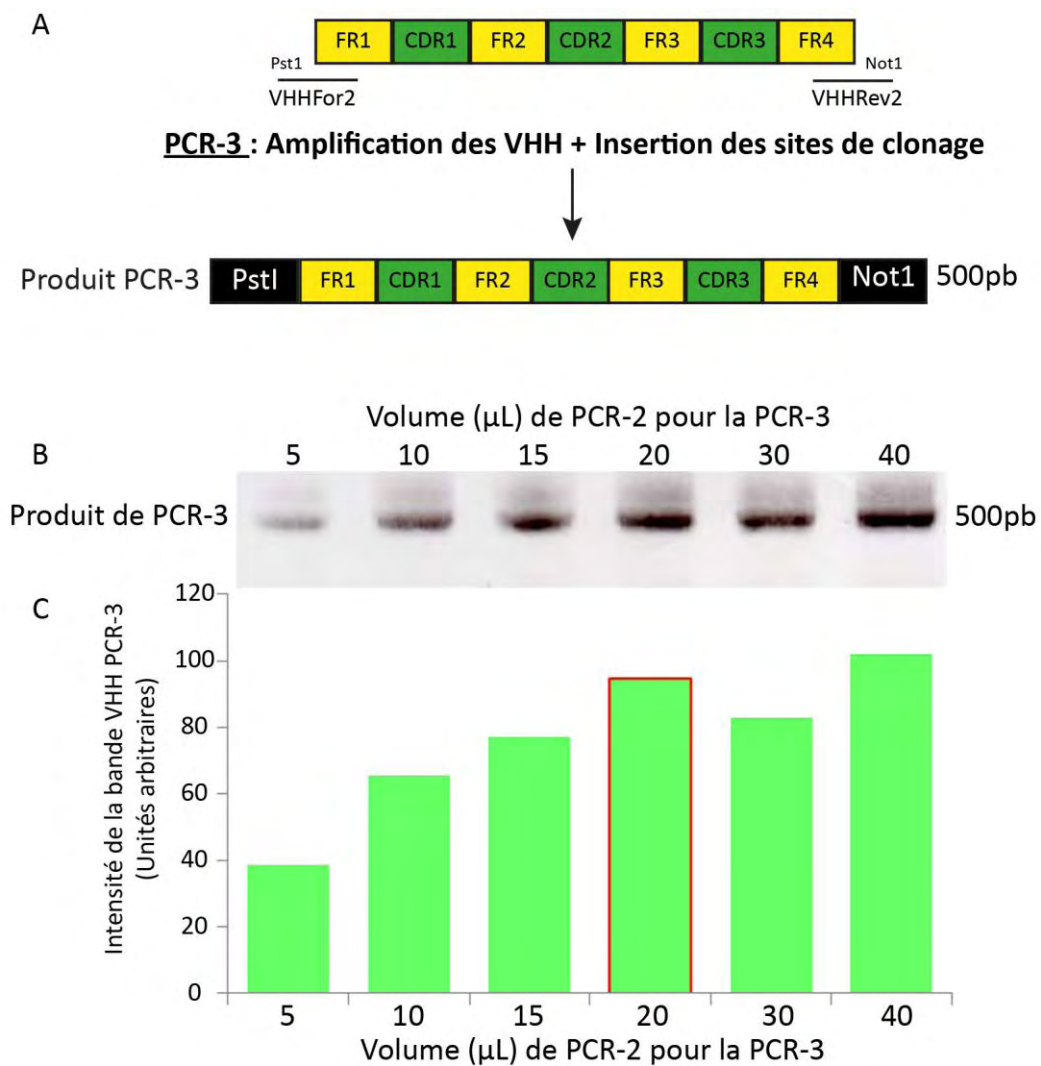


Figure 26. Mise au point de la PCR-3.

A. Schéma de l'amplification des produits de PCR-2 par la PCR-3. B. Différents volumes de PCR-2 sont utilisés comme matrice pour la PCR-3. Les produits de PCR-3 sont séparés en gel d'agarose. C. L'intensité des bandes à 500pb est quantifiée. La colonne encadrée de rouge représente les conditions optimales choisies pour amplifier toutes les séquences par PCR-3.

Enfin, la PCR-2 est elle-même utilisée comme matrice pour la PCR-3. La PCR-3 est nécessaire pour inclure les sites de restrictions requis pour le clonage des séquences des ANDc de VHH en plasmide (Figure 26 A). Pour cela, des amorces s'hybridant de part et d'autre du produit de PCR-2 (au niveau des régions FR1 et FR4) sont utilisées. Elles contiennent chacune un site de clivage pour les enzymes de restriction PstI ou NotI.

Toujours en suivant la même stratégie et pour préserver la diversité de la future banque, différents volumes de produits de PCR-2 sont testés. Le but est encore d'obtenir un produit d'amplification par PCR-3 optimal, sans pour autant multiplier inutilement le nombre de réactions de PCR-3 (Figure 26 B).

Après quantification des produits d'amplification par PCR-3 sur gel dans les différentes conditions, on observe qu'au-delà de 20 μ L de PCR-2 comme matrice, l'amplification ne produit pas de bande plus intense. En effet, la quantité d'amplificats produits par la réaction semble atteindre un plateau (Figure 26 C).

La condition retenue pour la PCR-3 est donc 20 μ L de PCR-2 comme matrice (colonne encadrée de rouge). La totalité des produits de PCR-2 est donc amplifiée par PCR-3 selon cette condition.

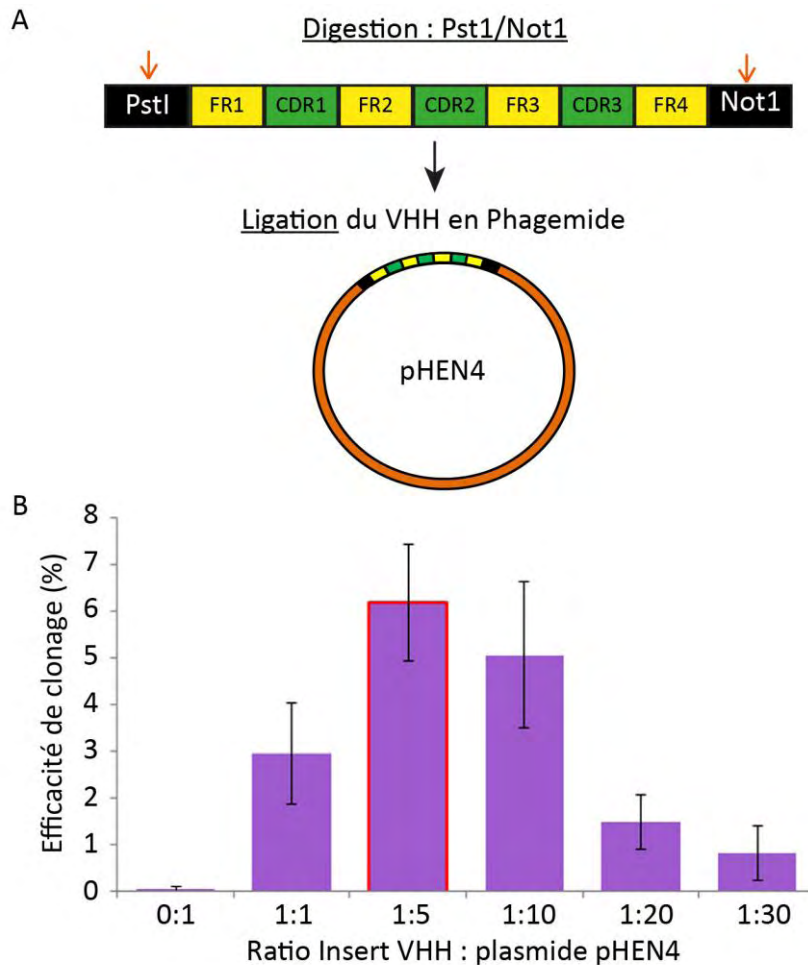


Figure 27. Mise au point de la ligation des ADNc VHH en phagemide pHEN4.

A. Représentation schématique de la ligation après digestion PstI/NotI des inserts en phagemide. B. Différents ratio de quantités d'insert VHH : plasmide pHEN4 sont testés pour la ligation. Les produits de ligations sont électroporés en bactéries compétentes et l'efficacité de clonage est estimée. L'efficacité de clonage est donnée par le rapport entre le nombre de clones bactériens transformés par le produit de ligation et le nombre de clones bactériens transformés par la même quantité de plasmide non digéré. La colonne encadrée de rouge représente les conditions optimale choisies pour clones les séquences VHH dans le pHEN4.



Figure 28. Totalité des boîtes de Petri utilisées pour la banque de VHH.

96 boîtes de Petri ont été utilisées pour étaler tous les clones bactériens électroporés par les séquences VHH clonées en pHEN4.

b. Clonage des ADNc de VHH en plasmide : création de la banque

Une fois les séquences d'ADNc de VHH amplifiées grâce aux PCR nichées, celles-ci sont purifiées, digérées, puis clonées en phagemide pHEN4 (don d'A. Olichon, Monegal *et al.*, 2011)) grâce aux sites de restriction insérés lors de la PCR-3. La ligation des inserts VHH est une étape critique de la création de la banque, car une ligation peu efficace conduirait à une diminution importante de la diversité de cette banque. Cette étape a donc subi une optimisation importante, notamment pour certains paramètres, comme le ratio insert : plasmide. Un échantillon des séquences VHH amplifiées est digéré par les enzymes PstI et NotI. Ce produit de digestion est utilisé pour tester la ligation en pHEN4 avec différents ratios ADNc VHH : pHEN4. Ces produits de ligation sont électroporés en bactéries électrocompétentes. L'efficacité de clonage est estimée en comparant le nombre de clones bactériens transformés par les produits de ligation et le nombre de clones bactériens transformés par la même quantité de plasmide pHEN4 non digéré (Figure 27). On observe que le ratio 1 : 5 est le plus intéressant, car il génère le plus de transformants pour la même quantité d'inserts.

Par conséquent, la totalité des séquences ADNc de VHH est clonée en pHEN4 dans les conditions 1 : 5. Les produits de ligation sont purifiés puis électroporés en bactéries électrocompétentes. La quantité d'ADN pouvant être électroporée étant restreinte (environ 100 ng dans 1 μ L maximum), 213 électroporations successives ont été nécessaires pour transformer tous les plasmides ligués dans les bactéries, ces électroporations ayant été étalées sur 96 boîtes de Petri 23 x 23 cm (Figure 28).

Le lendemain, la totalité des clones bactériens transformants est collectée et congelée. Parallèlement, le nombre total de clones issus des électroporations, reflétant la diversité estimée totale de la banque, est évalué. On estime que la banque de VHH est constituée d'environ **6,22.10⁷ clones**

Afin d'estimer si les conditions d'établissement de la banque n'ont pas favorisé l'amplification de certains clones au détriment du reste de la banque, 40 clones sont pris au hasard pour être séquencés (Figure 29). L'alignement de séquences des 40 clones nous permet de valider la banque par plusieurs aspects :

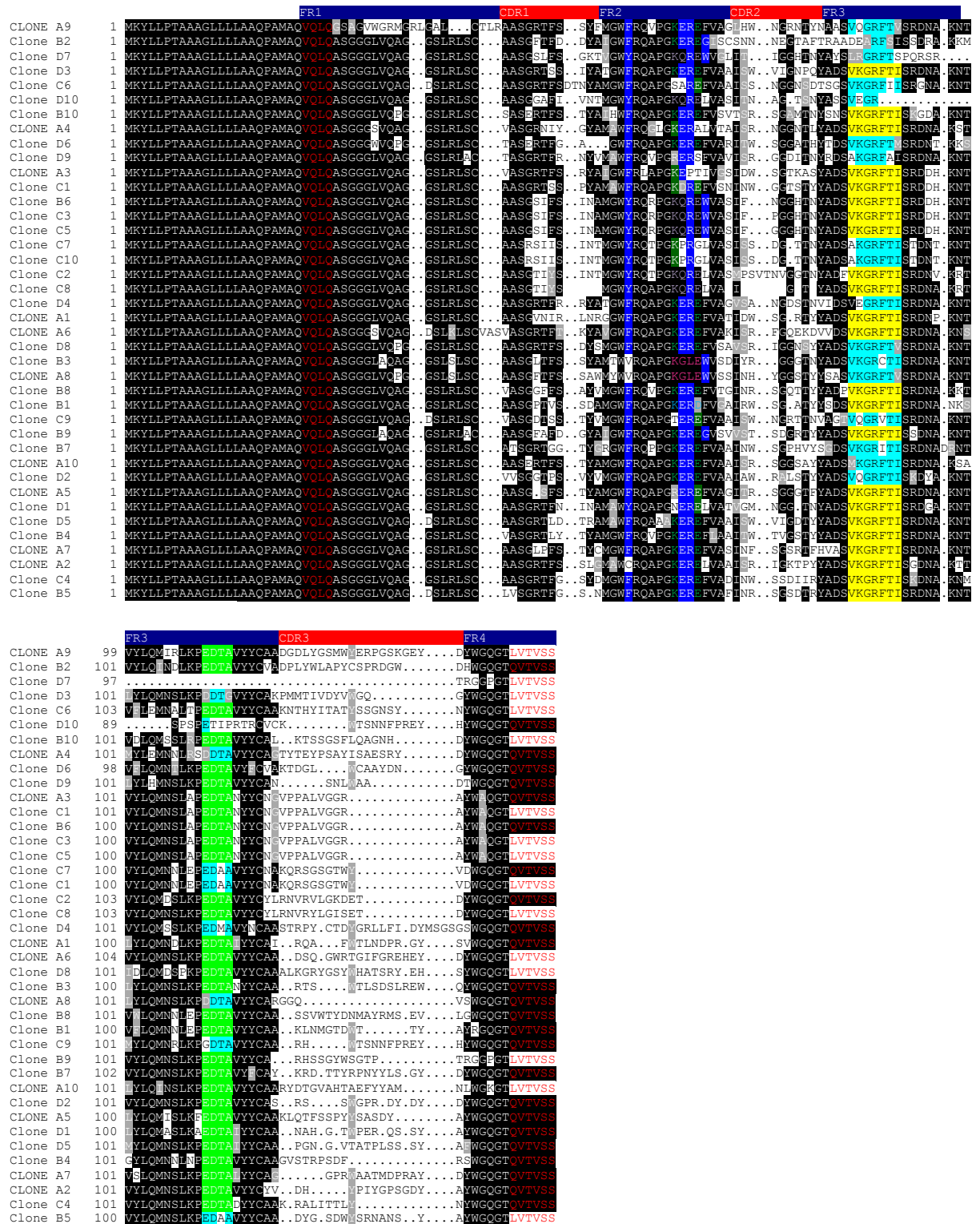


Figure 29. Alignement d'ADNc de 40 VHH de la banque.

40 clones bactériens de la banque ont été pris au hasard et l'insert VHH de chaque clone est séquencé. Marques classiques : **VQLQ** : séquence caractéristique du début de la région FR1. **F Y E R G** : résidus classiques de la région FR2, rendant la région plus hydrophile. **VKGRFTI** : Marque classique de la FR3 des Immunoglobulines G. **EDTA** : Séquence consensus de FR3, précédant la boucle CDR3. **LVTVSS** et **QVTVSS** : séquences terminales des VHH.

- la recherche par *Blast* révèle que toutes les séquences clonées sont des VHH. En effet, les différents domaines caractéristiques des VHH (FR1, 2, 3, 4 et CDR1, 2, 3) sont retrouvés. Comme attendu, les boucles CDR, responsables de l'interaction avec l'antigène, présentent une variabilité importante (tant au niveau de la séquence en acides aminés que dans leur longueur). C'est particulièrement le cas de la boucle CDR3, la plus longue, qui est très importante pour la reconnaissance de certains épitopes (Wesolowski *et al.*, 2009). On retrouve également dans la banque les substitutions caractéristiques des VHH dans la FR2 (importantes pour permettre l'interaction des VH avec les VL dans les anticorps classiques) : en effet, la Valine en position 37, Glycine 44, Leucine 45 et Tryptophane 47 (présents dans les VH) sont fréquemment remplacés par la Tyrosine en position 37, Acide glutamique 44, Arginine 45 et Glycine 47 dans les VHH, ce qui rend la région globalement plus hydrophile. Ces substitutions améliorent significativement la solubilité des VHH (Davies *et al.*, 1994), ce qui est un paramètre important si l'on souhaite utiliser ces VHH en intracellulaire.

Ainsi, la sélection et l'amplification spécifique des ADNc de VHH a été un succès. Néanmoins, alors que la plupart des VHH possèdent le motif caractéristique « KERE » dans la FR2, deux de ces séquences (A8 et B3) possèdent un motif KGLE, caractéristique des VH (Figure 29). Bien que la présence de ces VHH « VH-like » à hauteur de 5-10% soit un phénomène récurrent dans l'établissement de banques de VHH (Saerens *et al.*, 2004, Harmsen *et al.*, 2007), leur origine n'est pas clairement expliquée. Il pourrait s'agir d'artefacts inhérents à la purification des produits de PCR-1 sur gel ayant conduit à la récupération de VH classiques, ou bien de VHH ayant des caractéristiques partagées avec les VH (Monegal *et al.*, 2011). De manière surprenante, malgré la présence de motifs proche des VH, ces VH-like partagent la plupart des caractéristiques physico-chimiques des VHH classiques (solubilité, stabilité), et peuvent efficacement reconnaître leur antigène cible (Tanha *et al.*, 2002).

Aucune séquence n'est retrouvée en double parmi ces 40 séquences. Cela signifie que les conditions de PCR ont relativement bien conservé la diversité de la banque, et qu'aucun clone ne semble avoir été suramplifié pendant ces étapes. Si un clone a été effectivement suramplifié, on peut raisonnablement avancer qu'il n'excède pas 1/40^e (2,5%) de la banque.

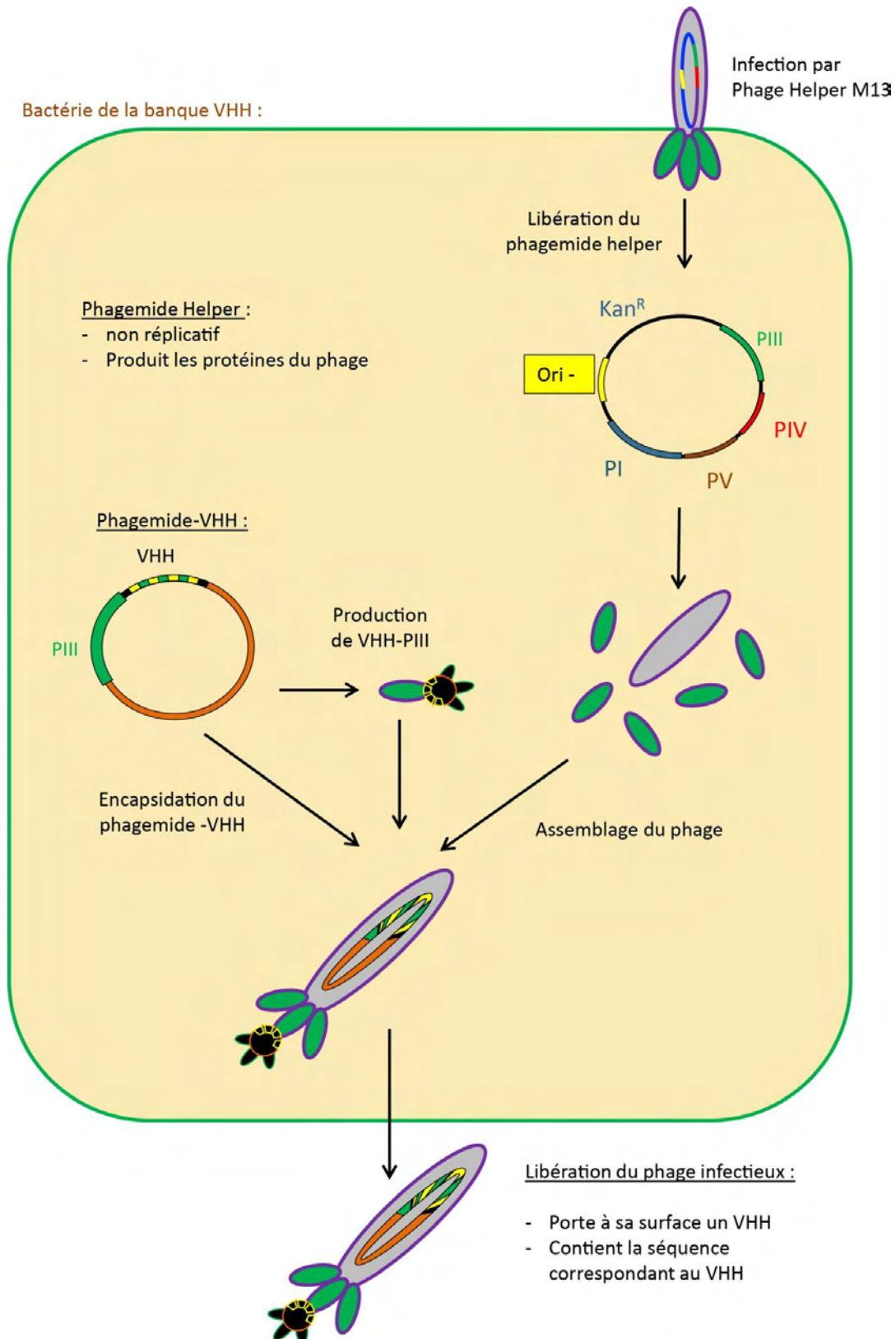


Figure 30. Production de phages-VHH.

Les bactéries de la banque de VHH sont infectées avec un phage *helper*. Lors de son entrée dans la bactérie, il libère son phagemide non réplcatif et produit les protéines nécessaires à la formation de nouveaux phages. Les phagemides de la banque produisent des protéines PIII fusionnées au VHH. Les phages nouvellement formés encapsident les phagemides de la banque et portent à leur surface les VHH fusionnés à la PIII et codés par les phagemides.

5) Sélection d'un nanobody anti- γ H2AX

Au sein de cette banque, il est maintenant nécessaire d'isoler les séquences codant pour des VHH reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée sur la serine 139 de γ H2AX. Pour cela, nous profitons du fait que le plasmide utilisé, un phagemide, est idéal pour le phage-display.

a. Phage display : principe

Le phage display est une technique *in vitro* permettant d'isoler des protéines avec une activité biologique sur la base d'une affinité, tels que les anticorps monoclonaux (Bradbury *et al.*, 2004). Le plus souvent, les techniques de phage display emploient des vecteurs phagemides dans lesquels sont exprimés des fragments d'anticorps (dans notre cas, des VHH) fusionnés avec la protéine de surface III (*capsid gene 3 product*, g3p ou PIII). Grâce à l'infection de bactéries par un phage « *helper* », ces phagemides sont encapsidés dans des phages filamenteux portant à leur surface la protéine PIII fusionnée à l'anticorps. Ainsi, par sélection d'affinité de l'anticorps de surface, il est possible d'isoler les phagemides codant pour l'anticorps possédant la spécificité désirée.

Dans notre problématique, nous souhaitons utiliser le phage display pour sélectionner les VHH spécifiques de γ H2AX à partir de la banque. Comme expliqué précédemment, les VHH ont été clonés dans des phagemides pHEN4 (phagemide-VHH), et peuvent donc s'exprimer fusionnés à PIII (VHH-PIII). Pour produire des phages portant à leur surface les VHH de la banque (phage-VHH), les bactéries de la banque sont infectées avec le bactériophage *helper* M13, contenant un phagemide non répliquatif mais codant pour toutes les protéines nécessaires à la formation de nouveaux phages. Après entrée du phage *helper* dans une bactérie de la banque, celui-ci libère le phagemide *helper* permettant l'expression des protéines nécessaires à la formation d'un nouveau phage (Figure 30). En parallèle, le phagemide-VHH de la banque exprime le VHH-PIII. Par conséquent, lors de la phase d'assemblage du phage, celui-ci porte à sa surface des protéines VHH-PIII, et encapside le phagemide-VHH de la

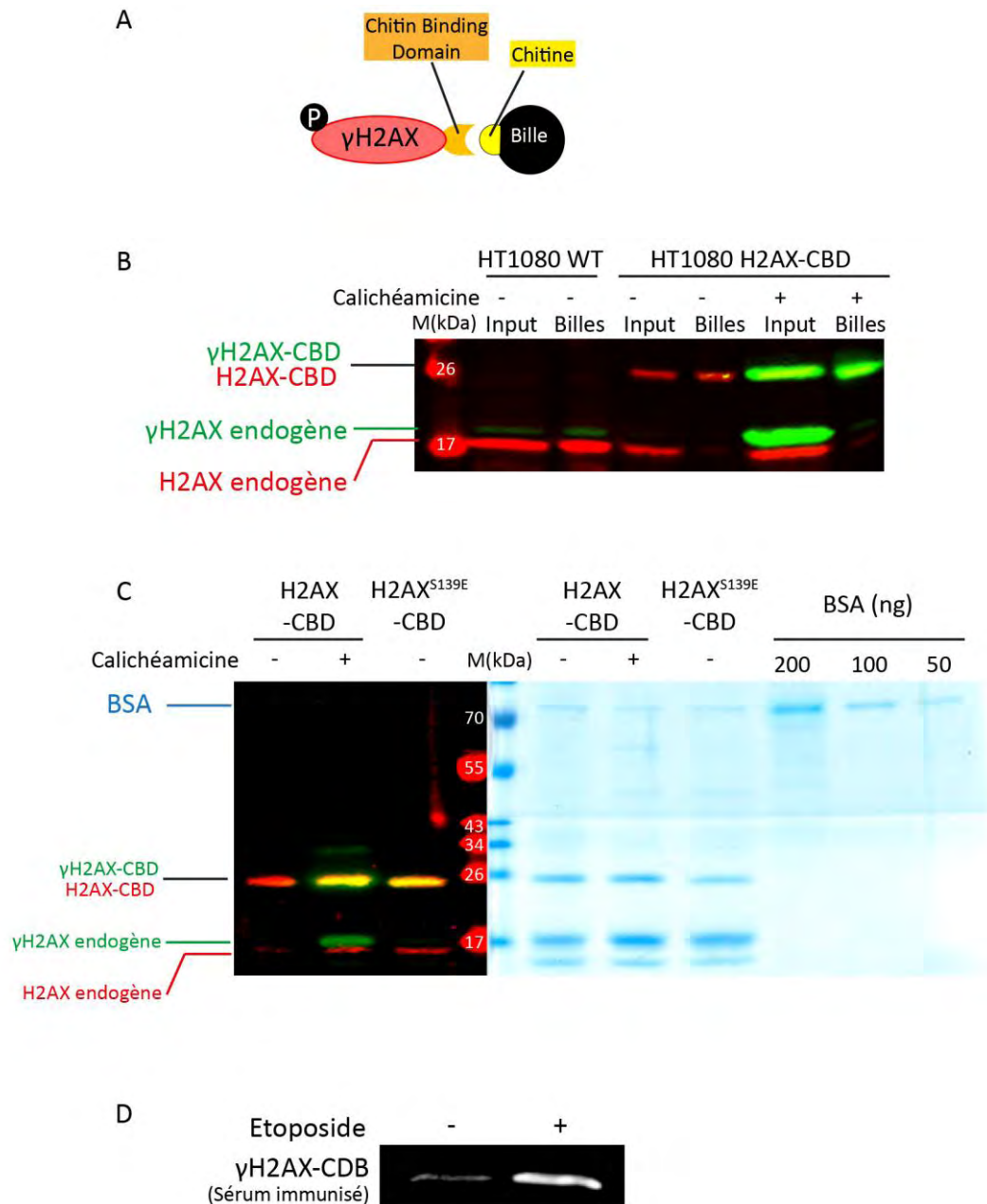


Figure 31. Purification de γ H2AX-CBD sur les billes de chitine.

A. Représentation schématique de la fixation de la protéine de fusion γ H2AX-CBD sur les billes de chitine. B. Des cellules HT1080 sauvages ou exprimant H2AX-CBD sont exposées ou non à la calichéamicine Y1 (1 nM, 1 h). Des billes de chitine sont incubées avec les extraits protéiques de ces cellules et sont analysées par western blot anti- γ H2AX (vert) ou anti-H2AX (rouge). Input : extrait total. Billes : protéines retenues sur les billes de chitines. M : marqueur de poids moléculaire (kDa). C. Estimation de la qualité de la purification de H2AX-CBD sur billes de chitines. Des extraits protéiques de HT1080 exprimant H2AX-CBD ou H2AX^{S139E}-CBD et traités ou non à la calichéamicine (1 nM, 1 h) sont incubés avec des billes de chitine et analysée par western blot (3 colonnes de gauche) anti γ H2AX (vert) ou H2AX (rouge) ou analysé par coloration au bleu de Coomassie (6 colonnes de droite). Des quantités croissantes de BSA (50, 100 ou 200 ng) ont été séparées sur ce même gel afin d'établir une gamme. D. Des extraits protéiques de HT1080 exprimant H2AX-CBD traités ou non à l'etoposide (25 μ M, 1 h) sont incubés avec des billes de chitine et analysée par western blot. Le sérum du lama immunisé est utilisé en tant qu'anticorps primaire et révélé par un anticorps secondaire anti-lama.

banque. Ainsi, en sélectionnant les nanobodies à la surface du phage pour leur capacité à lier γ H2AX, il est possible d'obtenir immédiatement la séquence ADNc associée.

b. Phage display : stratégies

Les phages-VHH produits à partir de la banque sont sélectionnés pour leur affinité à lier γ H2AX, grâce à une colonne de billes recouvertes de γ H2AX. Les phages retenus sur les billes sont ensuite élués pour réinfecter une nouvelle culture bactérienne et ainsi former une « sous-banque », enrichie en séquences codantes de VHH anti- γ H2AX.

Pour sélectionner les phages-VHH sur bille, nous avons fait le choix d'utiliser comme antigène une protéine γ H2AX endogène et non le phosphopeptide H2AX. En effet, étant donné que nous souhaitons obtenir un intrabody spécifique du γ H2AX endogène, tel qu'il est retrouvé à l'intérieur de la cellule, nous avons choisi le ligand le plus proche possible de ce γ H2AX endogène : une protéine de fusion γ H2AX étiquetée.

c. 1^{er} tour de phage display

➤ *Préparation de γ H2AX-Chitin Binding Domain sur billes de chitine*

Pour lier la protéine γ H2AX à des billes, nous avons choisi de la fusionner en N-terminal au domaine protéique CBD (*Chitin Binding Domain*) de 6kDa, qui présente une très forte affinité pour la chitine couplée aux billes (New England Biolabs, Figure 31 A). Cette protéine de fusion est exprimée stablement (voir les procédures expérimentales) en cellule humaine (HT1080). Afin d'induire la phosphorylation de H2AX sur la serine 139, les cellules sont traitées par un agent radiomimétique produisant des CDB, la calichéamicine Y1. Au cas où la phosphorylation de γ H2AX-CBD ne persisterait pas pendant le phage display (malgré l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases), nous avons également fait exprimer de façon stable une forme phosphomimétique de la

construction, où la serine 139 est remplacée par l'acide glutamique : H2AX^{S139E}-CBD. Néanmoins, un acide aminé phospho-mimétique étant légèrement différent d'une phosphorylation endogène, cette construction ne sera utilisée que si le γ H2AX-CBD endogène se révèle inadéquat (si la cellule ne phosphoryle pas H2AX-CBD par exemple).

Pour contre-sélectionner des phages non spécifiques de la phosphorylation de γ H2AX, nous avons également construit une forme non phosphorylable, où la serine 139 est remplacée par une alanine : H2AX^{S139A}-CBD. De manière surprenante, il a été impossible de faire exprimer la forme non phosphorylable en cellules humaine (lignée HeLa ou HT1080) : en effet, la construction a conduit à une mortalité massive des cellules, que ce soit après transfection ou après infection lentivirale. Les quelques clones survivant exprimaient une construction reconnue par l'anti γ H2AX commercial, donc phosphorylable, probablement la conséquence d'une réversion (données non montrées).

La quantité de protéines de fusion capturée sur billes est importante pour le phage display : en effet, suffisamment de protéines de fusion doivent être liées sur les billes pour que chaque phage-VHH de la banque, s'il est spécifique, ait une chance de se lier à γ H2AX-CBD. Il faut donc plus de protéines liées sur les billes que de clones dans la banque. Afin de réduire au maximum les protéines contaminantes se liant non-spécifiquement sur les billes de chitine -qui pourraient alors sélectionner des phages-VHH non spécifiques-, seule la fraction chromatinienne (contenant majoritairement les histones) est extraite. L'extrait chromatinien est ensuite incubé avec les billes de chitine pour capturer γ H2AX-CBD ou les formes mutées. Les billes sont alors soumises à des lavages répétés afin de mimer les conditions du phage display. La fixation et la phosphorylation de la construction sur les billes après ces lavages sont évaluées par western blot (Figure 31 B). On observe que la construction H2AX-CBD (26 kDa), est uniquement exprimée dans la lignée transfectée (Figure 31 B, colonnes 1 et 3) et qu'elle est phosphorylée en réponse aux CDB, comme le γ H2AX endogène (Figure 31 B, colonne 5). Par ailleurs, la construction H2AX-CBD se fixe efficacement sur les billes de chitine et reste phosphorylée, même après les lavages multiples (Figure 31 B, colonne 6). La quantité de protéines de fusion retenue est évaluée à 250 ng par condition, que

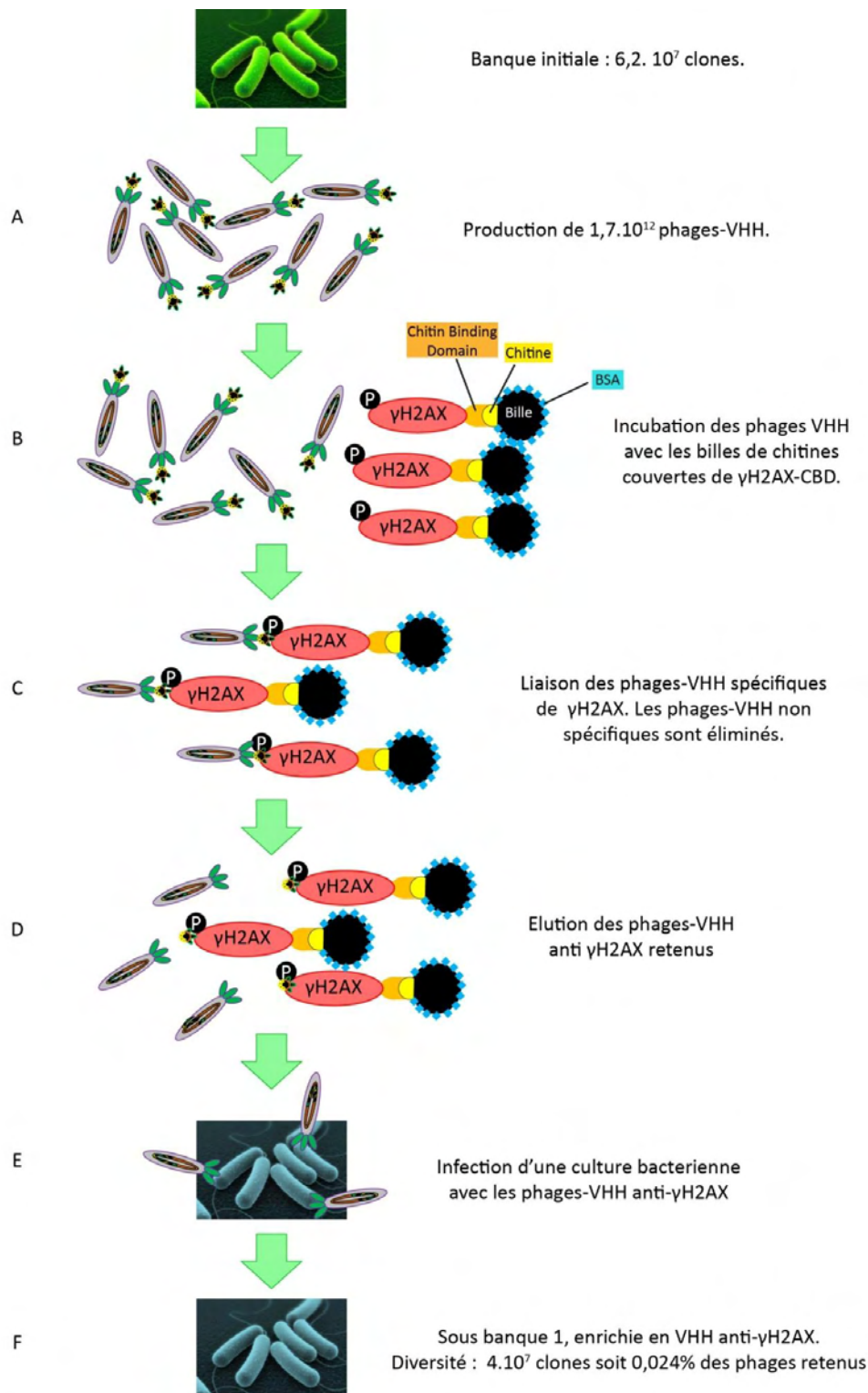


Figure 32. 1^{er} tour de sélection des phages-VHH anti γ H2AX par phage display.

A. Infection de la banque initiale avec des phages *helper* pour produire des phages-VHH. B. Incubation des phages avec des billes de chitines saturées à la BSA et recouverte de γ H2AX-CBD. C. Essentiellement les phages portant un nanobody anti- γ H2AX se lient à γ H2AX et sont retenus sur les billes. D. Elution des phages retenus par clivage du site *Tev* situé entre le VHH et la PIII. E. Infection d'une nouvelle culture bactérienne avec les phages retenus lors du 1^{er} tour de phage display. F. Création de la sous-banque 1, enrichie en phage-VHH anti γ H2AX.

ce soit pour H2AX^{S139E}-CBD ou γ H2AX-CBD (Figure 31 C), soit 10 ng de protéine de fusion par μ L de billes. Pour une même quantité de protéines de fusion liées sur les billes, H2AX^{S139E}-CBD et γ H2AX-CBD, la quantité de fluorescence émise par l'anticorps anti- γ H2AX est équivalente (Figure 31 C, colonnes 2 et 3). Etant donné que pour la forme phosphomimétique H139E, 100% des protéines de fusion liées sur les billes sont considérées comme phosphorylées, on peut considérer que 100% des protéines γ H2AX-CBD sont phosphorylées sur les billes en réponse à 1nM de calichéamicine. Dans ces conditions, plus de $2,31 \cdot 10^{14}$ molécules de H2AX^{S139E}-CBD ou γ H2AX-CBD / μ L de billes sont utilisables pour le phage display, ce qui est amplement suffisant pour notre banque de $6,2 \cdot 10^7$ clones. Enfin, de manière intéressante, lorsque H2AX-CBD est phosphorylé en réponse à l'etoposide, il est efficacement reconnu par le sérum immunisé (Figure 31 D). Ce résultat présage une fixation efficace des anticorps du sérum à ces billes.

➤ 1^{ère} sélection de phages-VHH anti γ H2AX

Le premier tour de sélection des phages-VHH a été effectué par Julien Vignard, dans l'équipe « Signalisation, GTPase Rho et cancer » (UMR 1037, Claudius Régaud). A partir de la banque, $1,7 \cdot 10^{12}$ phages-VHH sont produits (Figure 32 A) et mis en contact avec les billes de chitine recouvertes de γ H2AX-CBD, saturées à la BSA pour réduire la fixation non spécifique de phages (Figure 32 B). Les phages sélectionnés à l'issue de ce tour (Figure 32 C) sont élués par traitement à la trypsine qui, grâce à un site de clivage situé entre le VHH et la PIII, décroche les phages sans affecter leur infectivité (Figure 32 D). Ces phages sont ensuite utilisés pour infecter (Figure 32 E) une culture bactérienne et former ainsi une « sous-banque » enrichie en clones anti- γ H2AX (Figure 32 F). Le nombre de clones de cette sous-banque est évalué à $4 \cdot 10^7$, soit 0,024% des phages de la banque initiale ayant été retenus sur les billes.

Néanmoins, ce tour de sélection à lui seul ne permet pas de sélectionner uniquement des phages-VHH anti- γ H2AX. En effet, la chitine, le *Chitin Binding Domain*, et la BSA pourraient tout aussi bien retenir des phages-VHH, qui ne seraient alors pas spécifiques de γ H2AX. Pour éliminer ces phages contaminants et affiner la sélection, un

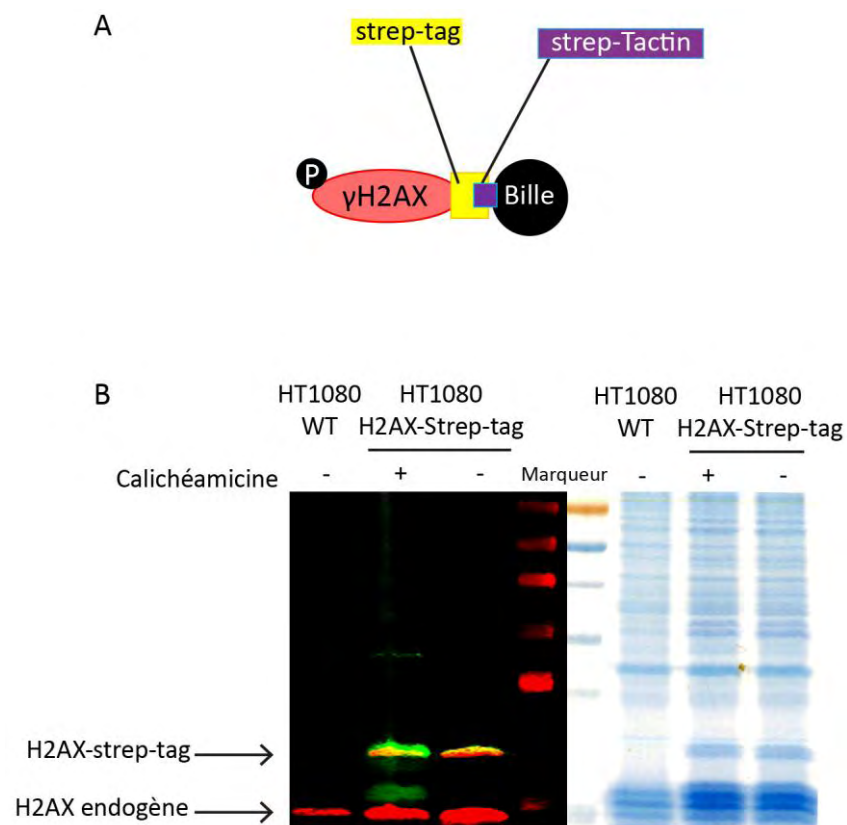


Figure 33. Purification de γ H2AX-strep-tag sur billes de strep-Tactin.

A. Représentation schématique de la fixation de la protéine de fusion γ H2AX-strep-tag sur les billes de strep-Tactin. B. Les cellules HT1080 exprimant la construction H2AX-strep-tag (HT1080 H2AX-strep-tag) ou non (HT1080 WT) sont traitées ou non à la calichéamicine (4 nM, 1 h). Les histones sont extraites et incubées avec des billes de strep-Tactin. La quantité de protéine H2AX-strep-tag liée aux billes est révélée par western blot (gauche) ou par coloration au bleu de Coomassie (droite). Rouge : Anticorps anti H2AX. Vert : anticorps anti γ H2AX.

deuxième tour de phage display est effectué. Lors de ce 2^e tour de phage-display, tous les composés ci-dessus sont changés (étiquette et système d'affinité, conditions de saturation des billes), afin que les phages contaminants potentiellement sélectionnés lors du premier tour ne soient pas retenus.

d. 2^{ème} tour de phage display

➤ *Préparation de γ H2AX-strep-tag sur billes de strep-Tactin*

Pour ce second tour de phage display, la liaison CBD-Chitine permettant la liaison de γ H2AX sur les billes de chitine, est remplacée par la liaison strep-tag/strep-Tactin (Figure 33 A, Lichty *et al.*, 2005, Schmidt *et al.*, 2007). Le strep-tag est un peptide composé de 8 acides aminés (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) qui possède une forte affinité pour une streptavidine modifiée, la strep-Tactin. Des expériences préliminaires ont démontré qu'utiliser un seul strep-tag fusionné à H2AX résulte en une affinité trop faible pour les billes de strep-Tactin, la construction ne persistant pas sur les billes jusqu'à la fin des lavages du phage display (données non montrées). Ce résultat est surprenant étant donné l'affinité élevée décrite pour cette construction (Schmidt *et al.*, 2007). Ainsi, pour augmenter l'affinité de la protéine de fusion avec la strep-Tactin, un double strep-tag est fusionné en N-terminal de H2AX pour former H2AX-strep-tag. Cette construction est exprimée stablement en cellule humaine HT1080 par infection lentivirale (réalisée par D. Jullien). Egalement, une forme phosphomimétique H2AX^{S139E}-Strep-tag et une forme non-phosphorylable H2AX^{S139A}-strep-tag ont été construites. Là encore, la construction H2AX^{S139A}-strep-tag semble être létale, puisqu'aucun clone exprimant correctement cette protéine de fusion n'a pu être obtenu, quelle que soit la méthode (transfection ou infection lentivirale).

Comme attendu, on observe que la protéine de fusion γ H2AX-strep-tag se lie aux billes de strep-Tactin (Figure 33 B, colonnes 2, 3, 6 et 7) et qu'elle est correctement phosphorylée après induction de CDB par le traitement calichéamicine (Figure 33 B,

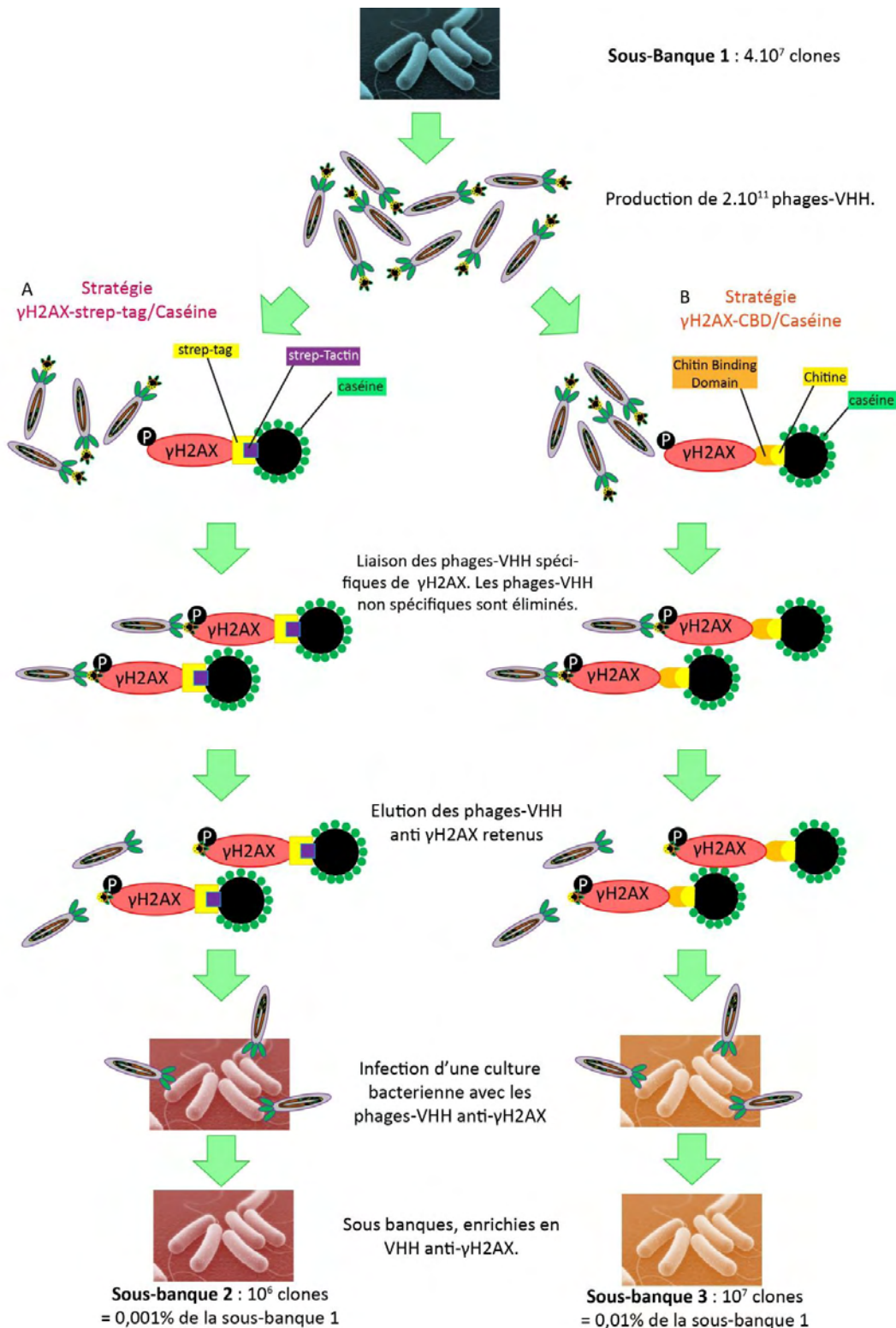


Figure 34. 2^{ème} tour de phage display pour la sélection de phages anti γ H2AX.

La sous-banque 2 est infectée par un phage *helper* pour produire de nouveaux phages-VHH. Ces phages sont sélectionnés selon deux stratégies complémentaires : A. La moitié des phages produits est incubée avec des billes de strep-Tactin saturées à la caséine et recouvertes de γ H2AX-strep-tag. Les phages sont élués comme précédemment, et utilisés pour infecter une culture bactérienne et former la sous-banque 2. B. L'autre moitié des phages produits est incubée avec des billes de chitine saturées à la caséine et recouvertes de γ H2AX-CBD. Les phages sont élués comme précédemment, et utilisés pour infecter une culture bactérienne et former la sous-banque 3.

colonne 2). Cependant, malgré nos tentatives pour améliorer la purification, beaucoup de contaminants non spécifiques semblent se lier aux billes de strep-Tactin (Figure 33 B, colonnes 5,6 et 7). De plus, l'utilisation de conditions plus stringentes conduit au décrochage de la construction γ H2AX-strep-tag plutôt que des contaminants (données non montrées).

➤ 2^{ème} sélection de phage-VHH anti- γ H2AX

Bien que le fait de changer d'étiquette (strep-tag au lieu de CBD) soit un avantage certain dans la sélection des VHH, les protéines contaminantes persistantes sur les billes de strep-Tactin pourraient mener à la sélection de phages-VHH non-spécifiques de γ H2AX, et finalement nuire à l'efficacité du 2^{ème} tour de phage display. Par conséquent il n'est pas souhaitable de compter uniquement sur cette stratégie et deux stratégies de sélection en parallèles ont donc été envisagées (Figure 34) :

- une stratégie utilisant la construction γ H2AX-CBD sur des billes de chitine (comme pour le premier tour), cette fois les billes étant saturées avec de la caséine au lieu de la BSA (A). Il est ainsi possible d'éliminer les clones spécifiques de la BSA potentiellement sélectionnés au premier tour, tout en ayant un antigène efficacement fixé sur les billes. Néanmoins, avec cette stratégie, des phages-VHH anti chitine ou CBD peuvent persister.
- une deuxième stratégie utilisant la construction γ H2AX-strep-tag sur billes de strep-Tactin, saturées également à la caséine (Figure 34 B). Si la fixation de la construction n'est pas exempte de contaminations, cette stratégie devrait cependant permettre d'éliminer les phages-VHH anti-BSA, anti-chitine et anti-CBD.

A partir de la sous-banque 1, 2.10^{11} phages-VHH sont produits : la moitié de ces phages est utilisée pour la stratégie de sélection par γ H2AX-CBD saturé à la caséine (Figure 34 B), l'autre étant utilisée avec la stratégie mettant en œuvre γ H2AX-strep-tag saturée à la caséine (Figure 34 A). Le déroulement du second tour de phage display est techniquement très similaire au premier, et la sélection aboutit à deux nouvelles sous-banques (sélection effectuée par Julien Vignard) :

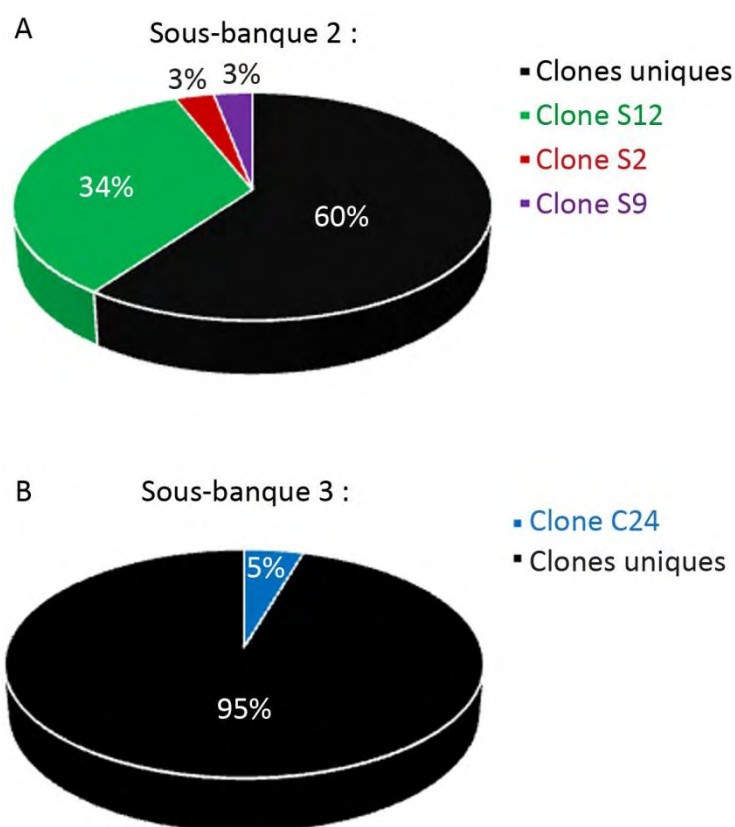


Figure 35. Clones des sous banques issues du 2nd tour de phage display.

64 colonies bactériennes sont aléatoirement prélevées dans les sous-banques 1 et 2 et l'ADNc des VHH est séquencé. Représentativité de certaines séquences de VHH retrouvés en plusieurs exemplaires dans la sous-banque 2 (A) ou dans la sous-banque 3 (B). Clones uniques : clones dont la séquence n'est retrouvée qu'une seule fois lors du séquençage.

- la **sous-banque 2** (issue de la stratégie γ H2AX-strep-tag/caséine) composée d'environ 10^6 clones, soit 0,001 % du pool des phages produits par la sous-banque 1.
- la **sous-banque 3** (issue de la stratégie γ H2AX-CBD/caséine) composée d'environ 10^7 clones, soit 0,01 % du pool des phages produits par la sous-banque 1.

e. Analyse des sous-banques 2 et 3

A l'issu de l'établissement des sous-banques 2 et 3, 64 colonies bactériennes sont aléatoirement prélevées dans chacune de ces sous-banques et l'ADNc des VHH qu'elles possèdent est séquencé afin de caractériser la diversité obtenue dans ces sous-banques.

De manière intéressante, on observe que dans la sous-banque 2, la même séquence VHH (S12) est retrouvée pour 34% des clones séquencés (Figure 35 A). Par ailleurs, deux autres clones (S2 et S9) sont aussi surreprésentés, puisqu'ils constituent chacun 3% des séquences de la sous-banque 2. Un seul clone est surreprésenté dans la sous-banque 3 (C24, Figure 35 B). Les clones surreprésentés ont été sélectionnés et amplifiés par les stratégies de phage display, très probablement grâce à leur affinité pour γ H2AX : ils représentent donc les candidats les plus intéressants pour obtenir des intrabodies anti- γ H2AX.

Un phage display efficace nécessite un bon dosage de la pression de sélection :

- Une pression trop forte (beaucoup de lavages, des lavages très stringents, très peu d'antigène...) peut décrocher les phages-VHH ayant une affinité moyenne pour γ H2AX mais intéressante, pour ne garder qu'un ou quelques clones avec une très forte affinité. Cet enrichissement trop important réduit considérablement le nombre de clones potentiellement intéressants à tester.

- Au contraire, une pression de sélection trop faible (peu de lavages, des lavages peu stringents, trop d'antigène...) ne permet pas de décrocher les phages-VHH non

spécifiques de γ H2AX, résultant en un enrichissement trop faible et en l'accumulation d'un grand nombre de phages-VHH faiblement affins.

Il y a plus de clones surreprésentés dans la sous-banque 2 que dans la sous-banque 3, cela suggère que la stratégie γ H2AX-strep-tag/strep-Tactin, malgré ses contaminants, a permis d'enrichir certains clones. La stratégie strep-tag/strep-Tactin semble exercer une pression de sélection plus forte que la stratégie γ H2AX-CBD/Chitine. Ceci peut s'expliquer par la plus grande quantité d'antigène γ H2AX sur les billes de chitine d'une part, favorisant la sélection de plus de clones moins spécifiques. Et d'autre part, le tag CBD ayant été utilisé lors du premier tour et du second tour, des phages-VHH dirigés contre ce tag ont pu être sélectionnés et contaminer la sous-banque 3. Cependant, les clones uniques obtenus sont également des candidats intéressants, il peut s'agir de VHH spécifiques de γ H2AX, mais n'ayant pas été autant amplifiés que les clones surreprésentés. En conclusion, la présence de quelques clones surreprésentés et de clones uniques est le signe que la pression de sélection du phage display est équilibrée.

6) Crible d'un intrabody recruté aux CDB

Il est important de déterminer si les VHH sélectionnés lors du phage display sont capables de reconnaître γ H2AX au sein même d'une cellule, et donc d'être relocalisés au niveau des sites de CDB. Denis Jullien a cloné en vecteur d'expression mammifère les ADNc des VHH sélectionnés pour les sous-banques 2 et 3. Les VHH sont fusionnés en C-Terminal à la protéine fluorescente rouge mCherry car, au niveau structural, l'extrémité C-terminale est située à l'opposé du site de reconnaissance de l'antigène (Figure 18, Muyldermans *et al.*, 2001). La fusion de la mCherry (28 Kda) en C-Ter ne devrait donc pas gêner la reconnaissance de l'antigène par le VHH.

Cette construction VHH-mCherry permet de suivre les VHH en temps réel et dans les cellules vivantes, par vidéo-microscopie. La capacité du VHH-mCherry à être relocalisée au CDB est estimée par microirradiation localisée : une impulsion laser focalisée sur les noyaux des cellules, irradie localement l'ADN nucléaire et provoque

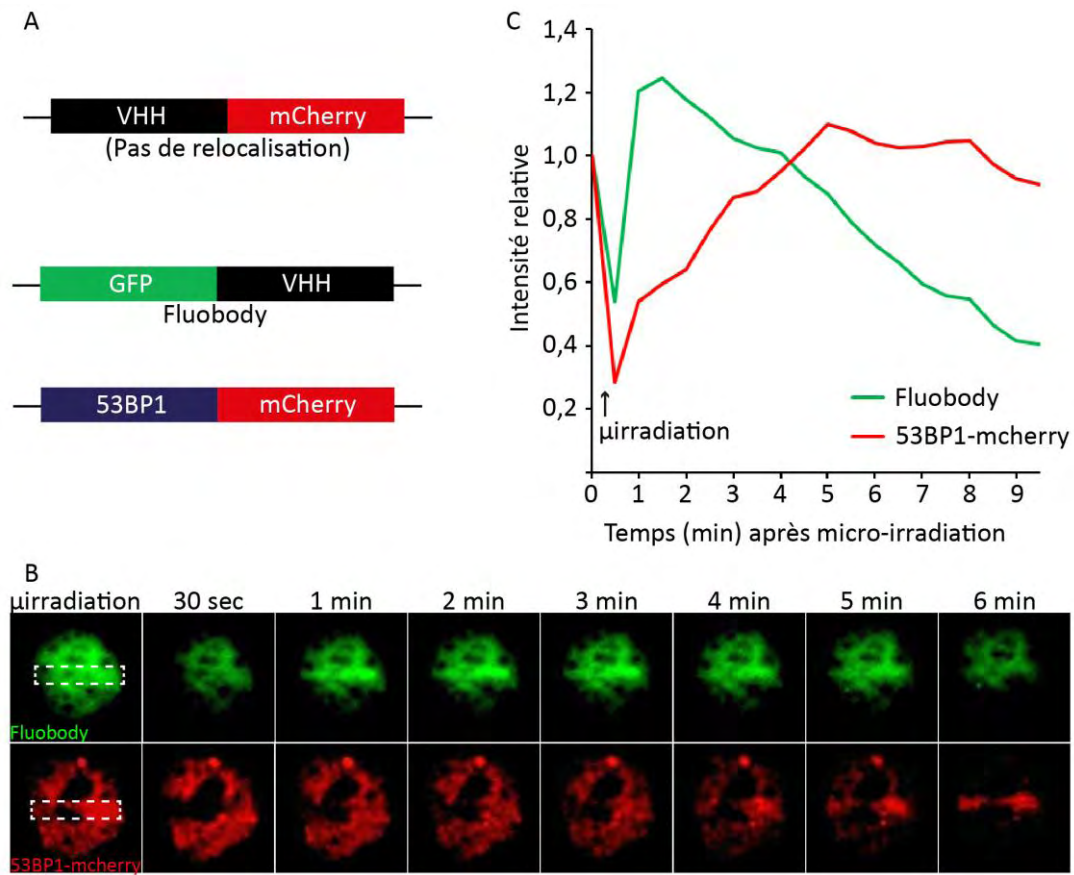


Figure 36. Les fluobodies se relocalisent en temps réel aux CDB induites par microirradiation.

A. Constructions utilisées pour cribler les VHH anti γ H2AX. La fusion en C-Ter de la mCherry ne permet aucune relocalisation du nanobody aux CDB. Fluobody : VHH sélectionné dans la sous-banque 2 ou 3 fusionné en N-Ter à la GFP, exprimé de façon concomitante à la construction 53BP1-mCherry servant de contrôle de formation de CDB. B. Imagerie en temps réel par fluorescence de la relocalisation d'un fluobody (vert) et de la construction 53BP1-mCherry (rouge) au dans la zone de microirradiation (cadre en pointillés). C. Intensité du signal GFP ou mCherry au site de microirradiation au cours du temps rapporté sur l'intensité du signal avant microirradiation.

plusieurs types de dommages selon le laser et la puissance, dont des pontages interbrins, des CSB (Kong *et al.*, 2009), des endommagements de bases (Lan *et al.*, 2004) et des CDB (Lukas *et al.*, 2003). Nous utilisons le laser 800nm *Near Infrared Femtosecond* qui est l'un des plus efficaces pour provoquer spécifiquement des CDB, sans pré-sensibilisation de l'ADN au BrdU (Kong *et al.*, 2009, Botchway *et al.*, 2010).

Curieusement, aucun VHH fusionné avec la mCherry en C-Ter ne se relocalise aux CDB induites par microirradiation localisée (Figure 36 A). Afin de déterminer si ce résultat provient de la mCherry, nous avons changé de tag fluorescent, ainsi que sa position. Tous les VHH ont alors été fusionnés en N-Terminal avec la GFP (Figure 36 A). On observe alors une relocalisation de certains fluobodies au niveau de la zone de microirradiation en une minute (Figure 36 B et C). Les nanobodies, de par leur petite taille, sont intrinsèquement très mobiles dans le noyau, et sont capables de récupérer d'un photoblanchiment en environ 20 secondes (Rothbauer *et al.*, 2006). Nous observons qu'une partie du signal GFP photoblanchi par l'irradiation est effectivement récupéré en moins de 30 secondes (Figure 36 B et C). En environ 1 minute, le fluobody s'accumule à la zone microirradiée. Afin de confirmer que l'irradiation laser a effectivement créé des CDB, la relocalisation d'un marqueur de CDB connu fusionné à la mCherry (53BP1-mCherry) est testée en parallèle. 53BP1 étant un marqueur plus tardif de CDB, il est spécifiquement relocalisé en 5 minutes au site irradié (Figure 36 B et C). De plus, l'accumulation de 53BP1-mCherry au site irradié coïncide avec la diminution du signal du fluobody.

7) Procédures expérimentales

Immunisation du lama

Le lama (nom : Dalai) a été hébergé à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) et pris en charge par Hervé Cassard (Maître de conférence à l'ENVT). Il a été immunisé simultanément contre un phosphopeptide-H2AX (KKATQASSQEY, phosphorylé sur la sérine) ainsi que contre 5 autres phosphopeptides (cibles

développées par le laboratoire). Pour chaque injection, un cocktail des 6 peptides contenant 100 µg de chaque peptide couplé au *carrier* KLH (peptides synthétisés par EUROGENTEC) est préchauffé à 40°C et mélangé extemporanément à un volume équivalent d'adjuvant de Freund complet ou incomplet (DIFCO) pour former une émulsion d'environ 2 mL. La procédure d'immunisation du Lama débute par une injection initiale du cocktail de peptides/KLH avec adjuvant de Freund complet, puis est suivie de 4 injections (rappels) de cocktails avec alternativement adjuvant de Freund incomplet ou complet. Chaque *boost* est espacé de 17 à 27 jours. 4 jours après le dernier *boost*, 500 mL de sang total sont prélevés pour créer la banque de VHH et pour évaluer l'efficacité d'immunisation par dot blot.



Isolement des lymphocytes à partir du sang total de lama

Les lymphocytes sont isolés à partir du sang total. Brièvement, les cellules sanguines sont séparées par centrifugation selon leur densité grâce à un gradient de polysucrose et sodium diatrizoate (kit Uni-SEP, Abcys). Les lymphocytes forment un anneau blanc visible qui est alors prélevé. La quantité de lymphocytes obtenue est estimée par comptage par cellule de Malassez.

Extraction d'ARN totaux

Pour l'extraction des ARN totaux de lymphocytes de lama, 6.10^6 cellules par minicolonne ont été utilisées (*RNeasy*, Qiagen). Pour les autres extractions, la quantité de cellules lysées est indiquée dans le texte. La quantité d'ARN extraite est évaluée par spectrophotométrie (DO 260nm).

Rétro-transcription des ARN en ADNc

La Rétro-transcription des ARN des lymphocytes en ADNc est basée sur l'hybridation d'amorces aléatoires (*random priming*). Sauf indication contraire, 1µg d'ARN est utilisé par réaction (*Superscript II First Strand synthesis*, Invitrogen).

*PCR pour la création de la banque***PCR-1 :**

Mix PCR-1	Volume
Tp HF (High fidelity, Finnzyme) 5X	8 µL
Primer Cal101 (100µM)	1 µL
Primer Cal102 (100µM)	1 µL
dNTP (10 mM)	0,8 µL
Eau nuclease free	26,2 µL
ADNc issu de la RT	2,5 µL
Phusion (FinnZyme) (2U/µL)	0,5 µL

Température et temps	Cycles
94 °C : 5 min	1
94°C : 1min	
52°C : 1 min 30 sec	22
72°C : 1min 25sec	
72°C : 10min	1
4 °C	1

Séquences des amorces de la PCR-1:

Cal101: GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG

Cal102 : GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

PCR-2 :

Mix PCR-2	Volume
Tp HF (High fidelity, Finnzyme) 5X	8 µL
Primer Vhhp1 (100µM)	0,5 µL
Primer Vhhp2 (100µM)	0,5 µL
dNTP (10 mM)	0,8 µL
Eau nuclease free	25,2 µL
Produit de PCR1	4,5 µL
Phusion (FinnZyme) (2U/µL)	0,5 µL

Température et temps	Cycles
94 °C : 5 min	1
94°C : 30 sec	
52°C : 30 sec	8
72°C : 1min	
72°C : 10min	1
4 °C	1

Séquences des amorces de la PCR-2:

Vhhp1 : CCAGCCGGCCATGGCTGAKGTBCAGCTGGTGGAGTCTGG.

Vhhp2 : GGACTAGTGC GGCCGCGTGAGGAGACGGTGACCWGGGT

PCR-3 :

Mix PCR-3	Volume	Température et temps	Cycles
Tp HF (High fidelity, Finnzyme) 5X	8 µL	94 °C : 5 min	1
Primer Vhhp1 (100µM)	2 µL	94°C 50 sec	20
Primer Vhhp2 (100µM)	2 µL	Rampe jusqu'à 55°C à 0,3°C/sec	
dNTP (10 mM)	2 µL	55°C :30 sec	
Eau nuclease free	4 µL	Rampe jusqu'à 72°C à 0,5°C/sec	
Produit de PCR2	20 µL	72°C : 1 min	1
Phusion (FinnZyme) (2U/µL)	2 µL	72°C : 10 min	
		4°C	

Séquences des amorces de la PCR-3 :

VhhFOR2 :

AACATGCCATGACTCGCGGCTCAACCGGCCATGGCTGAKGTBCAGCTGCAGGCGTCTGGRGG
AGG

VhhREV2 :

GTTATTATTATTCAGATTATTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCWGGGTCC

Purification d'ADN

La purification des bandes d'ADN a été effectuée sur gel (*SV gel & PCR purification Wizard system*, Promega).

La purification de la totalité des produits des digestions PstI/NotI de la PCR3 et de la totalité des produits de ligation est effectuée par phénol/chloroforme. Un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1) est ajouté par volume de préparation à purifier, le mélange est vortexé 30 secondes, puis centrifugé 10 min à 4°C à 10 000g. La phase aqueuse contenant l'ADN est prélevée et l'ADN qu'elle contient est précipité par l'ajout d'1/10^e de volume d'acétate de sodium 3M et de 2,5 volume d'éthanol 100%. Le mélange est placé à -80°C pendant 30 min puis centrifugé 30 min à 4°C à 10 000 g. Le culot est rincé à l'éthanol 70% puis séché et repris par 250 µL d'eau ultrapure.

Digestion des produits de PCR-3 par PstI/NotI

Digestion PstI/NotI des inserts	Volume
PCR-3 purifiée	7920 μ L
PstI (Fermentas) 10U/ μ L	396 μ L
NotI (Fermentas) 10U/ μ L	396 μ L
Tampon Fast Digest (Fermentas) 10X	1584 μ L
H ₂ O distillée	1584 μ L

Incubation du mix de digestion 12h à 37°C.

Ligation des inserts VHH digérés PstI/NotI en pHEN4

Réactifs pour ligation	Volume (μ L)
Buffer T4 DNA ligase (Fermentas) 10X	1000
47,5 μ g de pHEN4 digéré PstI/NotI purifié	1583,3
19,4 μ g Insert VHH purifié	242,8
T4 DNA Ligase (Fermentas) 5U/ μ L	400
Eau distillée	6773,9

Incubation 1h à 24°C, 12h à 16°C.

Production de bactéries électrocompétentes et électroporation

Une culture bactérienne de 250mL de bactéries TG1 (dont la densité optique à 600 nm a atteint 0,5) est refroidie 1 h sur glace puis centrifugé 8 minutes à 3000 g. Le culot est resuspendu doucement par 250 mL d'Hepes 1mM pH7,4 et centrifugé 8 minutes à 2800g. Le culot est resuspendu par 10 mL d'Hepes 1mM pH7,4 10% glycérol, puis centrifugé 6 minutes à 2800g. Le culot est resuspendu dans 625 μ L d'Hepes pH7,4 puis aliquoté par 50 μ L. L'électrocompétence des cellules est évaluée à $1,6 \cdot 10^9$ transformants/ μ g d'ADN par l'électroporation test d'un plasmide pUC19.

1 μ L de produit de ligation (contenant au maximum 20 ng de plasmide ligué) est incubé avec 50 μ L de bactéries électrocompétentes. Le mélange est électroporé en cuve d'1 cm (voltage : 2500 V/cm) et resuspendu dans 1mL de milieu SOC (Glucose 0,5%) préchauffé à 37°C et étalé sur gélose (23 x 23 cm) TYE agar 0,5% glucose + ampicilline à 37°C sur la nuit.

Phage display

Le phage display a été effectué au sein de l'équipe « Signalisation, GTPase Rho et cancer » (UMR 1037, Claudius Régaud).

Production des phages-VHH : 10^9 bactéries de la banque sont cultivées en milieu TY Ampicilline 100µg/mL 1% glucose jusqu'à obtenir $2,5 \cdot 10^{10}$ bactéries. Cette culture est infectée par 10^{12} phages *helper* KM13 (résistants à la kanamycine) pendant 1h à 37°C puis centrifugée 10 minutes à 800 g. Le culot bactérien est repris par du milieu TY Ampicilline 100µg/mL et Kanamycine 75µg/mL et incubé 16h à 30°C sous agitation.

Purification des phages : La culture est centrifugée 20 min à 5000 g. Les phages contenus dans le surnageant sont précipités grâce à 10mL de PBS, PEG-8000 20%, NaCl 2,5 M dans la glace pendant 1h, puis sont centrifugés à 3000g 30 minutes. Les culots sont repris dans du PBS puis centrifugés à 5000g. La quantité de phages contenus dans le surnageant est évaluée par DO_{280} sachant que $1 DO_{280} = 3 \cdot 10^{10}$ phages/mL.

Premier tour de phage display : $1,7 \times 10^{12}$ phages (saturés par 5% de BSA) sont incubés avec les billes de chitines recouvertes de γ H2AX-CBD (saturées par 5% BSA) dans 1mL de tampon de lavage (Tris HCl pH8 100 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, triton 0,05%) + 5% BSA pendant 3 heures à 4°C sous agitation. Les billes ayant retenu les phages sont lavées 8 fois par le tampon de lavage et deux fois avec le tampon de lavage sans triton. Les phages sont décrochés par 2 µg/mL de trypsine 30 minutes sous agitation. Le surnageant contenant les phages est utilisé pour infecter une culture de $1,75 \cdot 10^9$ bactéries TG1, 1 heure sous agitation. Le mélange est étalé sur géloses TY agar, ampicilline 250 µg/mL, Glucose 0,5%, 16h à 30°C. Le nombre de colonies formées correspond au nombre de phages retenus sur les billes lors du tour. Pour former la sous-banque, les colonies sont grattées et resuspendues en milieu LB 50% glycérol pour stockage à -80°C.

Second tour de phage display : Le protocole est identique pour les billes de chitine recouvertes par γ H2AX-CBD, sauf que les phages sont lavés 18 fois au lieu de 8 fois. Pour les billes de Strep-Tactin recouvertes de γ H2AX-strep-tag (IBA), l'incubation avec les phages se fait dans un tampon de lavage (Tris HCl pH8 100 mM, NaCl 250 mM,

EDTA 1 mM) pendant 2 h à 4°C. Les phages sont lavés 18 fois avec le tampon de lavage (Tris HCl pH 8 100 mM, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM) au lieu de 8 fois.

Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa et HT1080 (ATCC) ont été cultivées en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) supplémentée en 10% de sérum bovin fœtal, 100 U/mL de Penicilline et 100 µg/mL de streptomycine à 37°C à 5% de CO₂.

Les transfections des constructions H2AX-CBD ou H2AX-strep-tag ont été effectuées par JetPEI (Polyplus transfection). Après transfection, les cellules ayant intégré stablement le plasmide, contenant une résistance à la généticine, sont sélectionnées pendant plusieurs semaines par traitement à la généticine (0,3 mg/mL).

Extraction d'histones et fixation des protéines de fusion sur billes

Fixation de H2AX-CBD sur billes de chitine (NEB) : Environ 2.10^6 cellules HT1080 exprimant la construction H2AX-CBD sont traitées par 4 nM de calichéamicine. Les protéines sont extraites selon un protocole d'extraction saline d'histones décrit précédemment (Shechter *et al.*, 2007). 80 µL de billes de chitine (*New England Biolabs*) en solution (0,5 µL de billes/µL de solution) sont préalablement lavées avec un tampon de lavage (Tris HCl pH 8 100 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM) et bloquées avec le tampon de lavage + BSA 5% (pour le premier tour de phage display) ou + β -caséine 0,5% (pour le second tour de phage display), 40 minutes à 4°C sous agitation. Les billes sont lavées 2 fois avec le tampon de lavage puis incubées dans 400 µL d'extraits d'histones pendant 16h sous agitation à 4°C. Après incubation, les billes sont lavées 10 fois avec le tampon de lavage 2 M NaCl puis incubées 1h30 à 4°C sous agitation dans 1,5 mL de tampon de lavage 2 M NaCl.

Fixation de γ H2AX-strep-tag sur billes de Strep-Tactin (IBA) : Le protocole est identique, sauf que le tampon de lavage des billes est le suivant : Tris HCl pH 8 100 mM, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM. Le blocage 5% BSA est remplacé par un blocage 0,5% β -caséine.

8) Discussion / Perspectives

a. Le marquage γ H2AX comme preuve de concept

La création d'un outil permettant de suivre l'apparition de CDB en temps réel et sur cellule vivante offrirait de nouvelles opportunités pour l'étude des CDB et pour décortiquer l'action de génotoxiques clastogènes. Pour cela, le choix du marqueur de CDB à suivre a été crucial. γ H2AX est le « *Gold standard* » en terme de suivi de CDB, les foyers γ H2AX se formant rapidement après la CDB et par le fait qu'une seule CDB puisse être détectée grâce à ce marqueur. Cependant, l'étude extensive de ce marqueur suggère qu'il pourrait parfois refléter d'autres types de lésions (Cleaver, 2011), notamment en réponse au rayonnement UV qui ne génèrent pas directement des CDB mais plutôt des dimères de pyrimidines, ou aux agents pontants (Mitomycine-C) qui induisent des pontages inter-ou intra-brin d'ADN. Le marquage γ H2AX est alors différent du marquage en réponse aux CDB : les foyers peuvent radicalement varier dans leur taille au sein d'une même population, allant du petit foyer au marquage pan-nucléaire fort (Limoli *et al.*, 2002). Dans ce cas, la quantification des foyers dépend de critères subjectifs et est susceptible de varier entre les expériences et les expérimentateurs. Par ailleurs, l'intensité du signal, très variable, serait en partie dépendante des phases du cycle cellulaire, contrairement au signal obtenu après induction de CDB par irradiations (de Feraudy *et al.*, 2010). Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ce marquage γ H2AX surprenant, en réponse aux UV :

➤ *Le signal γ H2AX ne marquerait pas que les CDB*

Lors de la réparation des dimères de pyrimidines par le NER, l'étape d'excision expose temporairement de l'ADN simple-brin, pouvant causer le recrutement de RPA-ATRIP-ATR. H2AX pourrait donc être phosphorylé par ATR au niveau de ces lésions (Hanasoge *et al.*, 2007).

➤ *Le signal γ H2AX marquerait des CDB indirectes*

D'une part, lors de la réparation des dimères de pyrimidines par le NER, une étape d'excision est nécessaire et provoque une cassure simple-brin. Si deux dimères de pyrimidines, proches et sur deux brins d'ADN complémentaires, sont réparés en même temps, cela conduit donc à la formation d'une CDB résultant des deux CSB. Par ailleurs, une étude a montré qu'une partie du signal γ H2AX en réponse aux UVA serait due non seulement à des dommages oxydatifs en clusters (bases oxydées, CSB), mais également à leur réparation (Greinert *et al.*, 2012). Dans ces cas, les foci γ H2AX marqueraient donc des CDB indirectes induites par les UV.

D'autre part, le rôle de la réplication a également été évoqué : des lésions bloquantes, comme les dimères de pyrimidines ou les pontages inter-brins bloquent les polymérases répliquatives classiques et conduisent à une phosphorylation de H2AX. L'idée que le marquage γ H2AX est lié à un blocage de la fourche est renforcée par l'augmentation des foci γ H2AX lorsque que la polymérase translésionnelle pol η est déplétée (Limoli *et al.*, 2002). Curieusement, cette phosphorylation ne dépendrait pas d'ATR (Cleaver, 2011), pourtant censé s'accumuler aux fourches de réplication bloquées, mais dépendrait plutôt d'ATM (de Feraudy *et al.*, 2010). Cependant, il est très difficile de déterminer si γ H2AX marque une fourche bloquée, ou une fourche effondrée ayant dégénéré en CDB (Cleaver, 2011).

Enfin, des doses élevées de rayonnements UV conduisent à la mort par apoptose de la cellule, or H2AX est phosphorylé dans tout le noyau lors de la fragmentation de l'ADN par DFF40 (Rogakou *et al.*, 2000), ceci expliquerait le marquage pan-nucléaire intense de γ H2AX en réponse aux UV. Ce marquage γ H2AX en réponse aux UV reste mystérieux et sujet à controverses, car il est difficile de déterminer si ce marquage témoigne de CDB indirectement produites par les UV, ou si γ H2AX est phosphorylé en réponse à d'autres lésions. Cependant, pour conclure, dans l'immense majorité des cas, γ H2AX en foci homogènes est considéré comme un marquage témoignant de la présence de CDB.

b. Comparaison avec les biomarqueurs de CDB existants

Reflétant le besoin actuel de pouvoir suivre en temps réel les dommages du génome, des outils recherchant à marquer l'apparition des CDB en temps réel ont vu récemment le jour.

➤ *Le système rapporteur γ H2AX/MDC1-luc2*

Le premier est un système intéressant reposant sur la reconstitution d'une luciférase en réponse aux CDB (Li *et al.*, 2011). Le gène H2AX et le domaine BRCT de MDC1 sont respectivement fusionnés aux fragments N- et C- terminaux de la luciférase de luciole. La stratégie est basée sur l'association connue entre γ H2AX et MDC1 au niveau des sites de CDB, rapprochant entre elles les extrémités N-Ter et C-Ter de la luciférase et reconstituant une luciférase active. En réponse aux CDB, les cellules exprimant ce système produisent alors un signal lumineux proportionnel à la quantité de CDB, qu'il est possible de quantifier. Cette stratégie a été appliquée avec succès sur une lignée cellulaire, mais également *in vivo* sur modèle souris : il est ainsi possible de localiser avec précision les cellules touchées par une irradiation localisée. Si les lignées exprimant ce biomarqueur ne manifestent pas de sensibilité particulière aux agents produisant des CDB, on peut s'interroger sur l'innocuité d'une surexpression de protéines de fusion (dont la production de MDC1 tronquée) et d'une activité Luciférase aussi intense (pouvant générer un stress oxydant local). Les auteurs n'excluent pas la possibilité que ce système, en influant sur la réponse aux CDB, produise des faux positifs. Par ailleurs, il n'est pas fait mention de la formation de « foyers luciférase » visibles en microscopie : selon les informations fournies par l'article, ce système semble pouvoir produire un signal lumineux global au sein d'un tapis cellulaire (ou d'une partie d'un animal) plutôt que des foyers individuels. L'impossibilité d'analyser avec précision la forme du signal semble être directement à l'origine de certains résultats étranges : les auteurs ont ainsi observé qu'en réponse aux radiations, les cellules produisent deux vagues successives de signaux γ H2AX-MDC1. La première vague reflèterait l'activation de la voie de réponse aux CDB alors que la deuxième pourrait correspondre en partie à l'activation de l'apoptose. Ce système est cependant

très intéressant, notamment pour ses applications *in vivo*, mais il nécessite plus de tests, notamment avec des sources de dommages variées, afin de s'assurer de la spécificité du signal γ H2AX-MDC1 mesuré.

➤ *Radio-immunoconjugués anti- γ H2AX*

Un inconvénient de l'immunofluorescence classique est de devoir fixer et perméabiliser des cellules pour permettre l'entrée des protéines massives que sont les anticorps. Afin de contourner ce problème et pouvoir utiliser les anticorps directement sur cellules vivantes, ceux-ci ont été conjugués à un peptide permettant leur entrée (Cornelissen *et al.*, 2011). Ce peptide est composé de l'activateur de transcription (Tat) de l'HIV, qui a la propriété de pénétrer la membrane plasmique, et d'une NLS, permettant l'adressage de l'anticorps au noyau. Grâce à ce système, un anticorps anti- γ H2AX radiomarké (^{111}In) ou fusionné à un fluorophore peut pénétrer dans les cellules vivantes et marquer les foyers γ H2AX en réponse aux CDB. Ce système a l'avantage de pouvoir être utilisé sur cellules ou animal vivant pour visualiser, après irradiation, les foci γ H2AX ou les organes subissant des CDB, sans avoir à modifier génétiquement les cellules ou animaux cibles. En revanche, ce système nécessite une production élevée d'anticorps, et une réaction de conjugaison optimisée, car chaque expérience consomme des quantités importantes d'anticorps. Contrairement à une lignée génétiquement modifiée, l'analyse des foci γ H2AX est restreinte à une certaine fenêtre, puisque 30 minutes au moins sont nécessaires pour l'entrée de cet anticorps dans la cellule et que celui-ci persiste jusqu'à 4h. Chez l'animal, ce système souffre des inconvénients liés à la taille importante des anticorps classique et à leur hétérogénéité de diffusion au sein des tissus. Par ailleurs, les anticorps classiques interagissent souvent fortement avec leur cible, et on peut se demander les conséquences d'une telle interaction sur la réponse aux dommages. En inhibant la réponse aux dommages, l'immunoconjugué pourrait affecter la survie des cellules en réponse aux irradiations. Enfin, on peut s'interroger sur l'innocuité d'un isotope radioactif utilisé pour marquer les anticorps afin de suivre les CDB. En médecine nucléaire, cet isotope (^{111}In , émettant un rayonnement gamma) est utilisé en routine pour marquer des leucocytes, lymphomes, cancers prostatiques, essentiellement grâce à des marqueurs

membranaire. L'impact sur l'ADN est donc considéré comme négligeable. En revanche, le radio-immunoconjugué anti- γ H2AX est au contact même de l'ADN, on peut se demander : quel est l'impact d'un tel rayonnement sur l'ADN, lorsque l'anticorps est au plus près ?

c. Améliorer le GFP-VHH

À la lumière des tests de détection de CDB en temps réel préexistants, notre test apporte des avantages complémentaires. En effet, la construction GFP-VHH anti γ H2AX sera exprimée constitutivement dans des lignées cellulaires, afin de ne pas limiter dans le temps l'étude des foyers γ H2AX (l'étude aux temps précoces, après traitement, sera possible, ainsi que les temps longs, de l'ordre de la journée ou de la semaine s'il n'y a pas de phototoxicité liée à l'observation). Par ailleurs, seules les protéines endogènes sont observées, et il n'y a pas de surexpression de protéines de la voie de réponse aux CDB. Enfin, les nanobodies ayant des interactions très dynamiques avec leurs cibles, il y a de plus peu de risques de nuire à la réponse aux CDB, mais cela devra être vérifié.

➤ Analyser le recrutement du nanobody face à d'autres sources de CDB

Si les premiers résultats semblent encourageants, des étapes de validations supplémentaires sont nécessaires avant de pouvoir utiliser ce système. En effet, un recrutement très rapide du fluobody a pu être observé au niveau des zones de microirradiation. Ce type d'irradiation génère des CDB très localisées, mais également d'autres types de dommages, ce qui en fait un bon outil pour cribler les fluobodies potentiellement intéressants. Afin de tester la spécificité de ces fluobodies pour les CDB uniquement, l'utilisation d'un système ne créant que des CDB est nécessaire, par exemple via le système AsiS1-ER (Iacovoni *et al.*, 2010). AsiS1 est une enzyme de restriction spécifique clivant entre 120 et 150 sites dans le génome humain. AsiS1 est exprimée fusionnée avec un domaine de liaison modifié au ligand du récepteur à l'œstrogène, qui se lie à l'hydroxytamoxifen (OHTam). En réponse à l'OHTam, la protéine de fusion est transloquée au noyau et induit des CDB à des sites spécifiques.

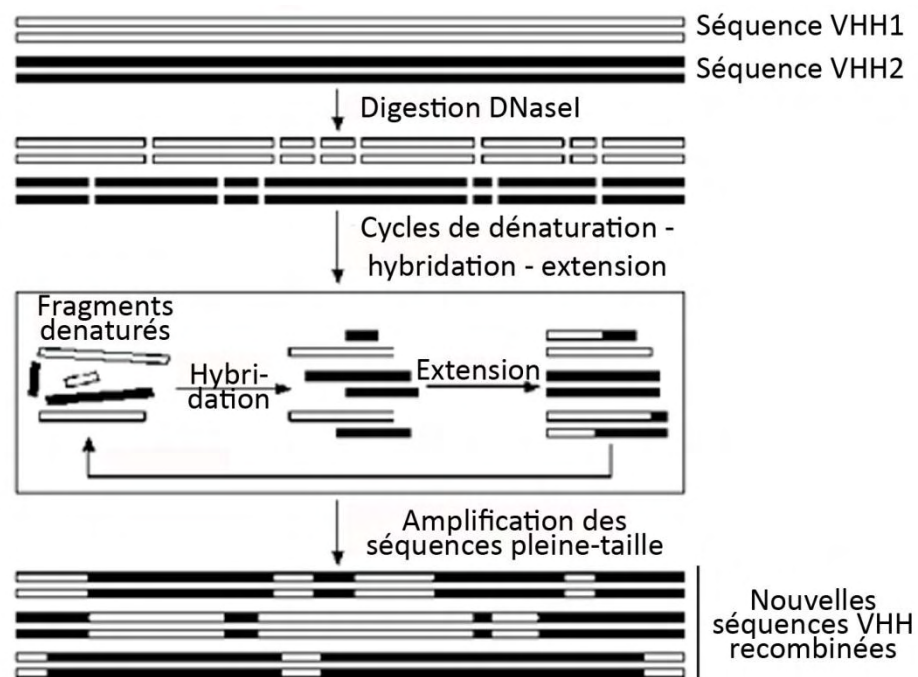


Figure 37. Principe du DNA shuffling.

Différentes séquences ADNc de VHH spécifiques de γ H2AX sont digérées et soumises à une réaction PCR sans ajouter d'amorce. Les ADNc ayant des séquences homologues, des séquences d'ADN simple-brin dénaturées de différents ADNc peuvent alors s'hybrider entre elles et former de nouveaux ADNc après élongation. Une PCR finale amplifie uniquement les fragments pleine-taille, qui ont plus de chances d'être fonctionnels (Adapté de Joern, 2003).

Grâce à ce système, il serait donc possible d'induire spécifiquement un nombre fixe de CDB et suivre alors le recrutement des fluobodies aux foyers γ H2AX, afin de valider notre modèle.

Un paramètre qu'il sera important d'analyser dans notre système est la sensibilité aux CDB. Bien qu'aucune protéine endogène de la voie de réponse des CDB ne soit modifiée ou surexprimée, la fixation d'un VHH sur γ H2AX, même transitoire, pourrait influencer la fixation des autres facteurs de la réponse aux CDB. Cela ne semble pas être le cas avec 53BP1, qui lors de son arrivée au site micro-irradié « chasse » le fluobody. Néanmoins, pour déterminer si l'expression du fluobody a un impact fonctionnel sur la réponse aux CDB, il sera crucial de comparer la survie aux CDB des cellules exprimant le fluobody à celles qui ne l'expriment pas.

Afin de mieux caractériser notre outil, il faudrait confirmer l'interaction spécifique entre le nanobody et γ H2AX. Pour cela, il serait utile de tester le recrutement du nanobody aux CDB dans une lignée de fibroblastes embryonnaires murins déficientes en H2AX et dans la lignée isogénique proficiente (Celeste *et al.*, 2003). Si le nanobody est spécifique de γ H2AX, aucun recrutement ne devrait être observé en micro-irradiation dans la lignée H2AX KO. Il est également possible de confirmer cette interaction par *pull-down* en testant la capacité de ce nanobody (fusionné à un tag) à se fixer sur des billes couvertes par γ H2AX ou H2AX.

Une fois confirmée, cette interaction devra être quantifiée en la comparant à des ligands de γ H2AX connus : anticorps commerciaux, MDC1... Ceci est possible par résonance plasmonique de surface. De telles données pourraient être intéressantes, d'une part pour comprendre le comportement du fluobody à la CDB (recrutement transitoire) mais également pour utiliser ce VHH pour d'autres applications. En fonction des résultats des tests d'interaction, il pourrait être nécessaire d'augmenter ou réduire l'affinité du VHH pour γ H2AX. Ceci est possible grâce au *DNA shuffling* (Joern, 2003), un type d'évolution moléculaire dirigée (Figure 37) permettant de recombiner entre elles plusieurs séquences (ici des VHH), afin d'obtenir de nouvelles séquences avec de nouvelles propriétés. Contrairement à la mutagenèse aléatoire, le *DNA shuffling* produit beaucoup plus de séquences fonctionnelles, ce qui

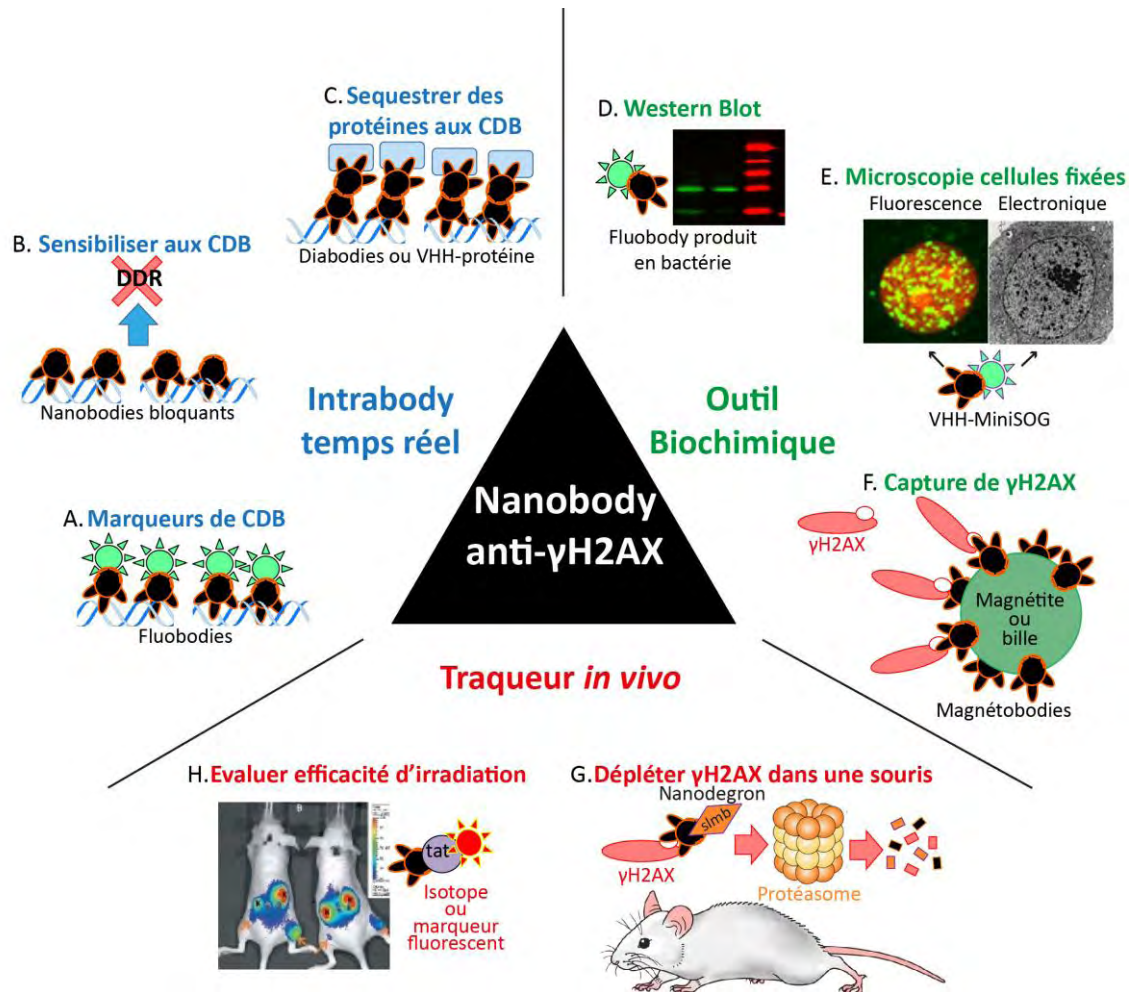


Figure 38. Applications d'un nanobody anti- γ H2AX

A. Intrabody fluorescent marquant en temps réel les CDB de l'ADN en se fixant aux CDB (outil développé dans ma thèse). B. Intrabody se relocalisant à la CDB mais bloquant la réponse cellulaire au CDB. Effet radiosensible potentiel. C. Séquestration de protéines aux CDB grâce à des diabodies (deux nanobodies fusionnée ayant des cibles différentes) ou un intrabody fusionné à une autre protéine. D. Utilisation du nanobody-GFP pour révéler γ H2AX en western blot. E. Nanobody fusionné à un tag bi-fonctionnel (mini-SOG), utilisable en immunofluorescence classique et en microscopie électronique à transmission. F. Des billes magnétiques recouvertes de ce nanobody anti- γ H2AX permettraient une immunoprécipitation rapide de γ H2AX et de ses partenaires. G. Fusionné à la protéine F-box (slmb) et exprimé en souris, le nanobody peut induire la dégradation spécifique de H2AX lorsqu'il est phosphorylé, dans un organe précis ou dans un animal entier. H. Fusionné à un isotope radioactif ou un marqueur fluorescent, le nanobody injecté peut cibler les cellules/les régions, phosphorylant H2AX en réponse à un agent génotoxique.

en fait une technique très rentable. Cette stratégie a déjà été utilisée pour recombinaison des VHH entre eux et obtenir des VHH plus thermostables (van der Linden *et al.*, 2000).

Il est également possible d'influer sur le recrutement du VHH-GFP à la CDB en reliant deux VHH (identiques ou différents) anti- γ H2AX par un *linker* et ainsi former un *diabody* (Holliger *et al.*, 2005). Un *diabody* formé de deux paratopes de VHH, aura une avidité probablement plus importante pour γ H2AX, ce qui pourrait permettre de créer des diabodies recrutés plus longtemps sur la CDB, ou perturbant volontairement la réponse aux CDB. Cette lignée deviendrait alors un modèle intéressant pour étudier la sensibilité aux CDB.

d. Autres utilisations potentielles de Nanobodies anti- γ H2AX

➤ *Utilisation in cellulo en temps réel*

Si son utilisation en tant que marqueur de CDB et/ou sensibilisant la cellule aux CDB se révèle intéressante (Figure 38 A et B), un intrabody anti- γ H2AX pourrait aussi être exprimé pour séquestrer certaines protéines aux foyers γ H2AX. Si le VHH est fusionné à une protéine d'intérêt, ou à un autre VHH dirigé contre une protéine d'intérêt (modifiée post-traductionnellement ou non), il serait possible d'adresser spécifiquement à la CDB des protéines dans les conformations qui nous intéressent (Figure 38 C). Par exemple, il serait intéressant de forcer la séquestration de BRCA1 ou 53BP1 au niveau de la lésion, afin de voir s'il est possible d'influer en temps réel sur les voies de réparation.

➤ *Utilisation in vitro*

L'utilisation *princeps* de ce nanobody anti- γ H2AX est en tant que marqueur intracellulaire, mais il pourra aussi trouver des applications dans d'autres domaines de la biologie. En effet, les VHH peuvent être produits en bactérie (Pellis *et al.*, 2012, Pollithy *et al.*, 2011a), levure (Frenken *et al.*, 2000, Harmsen *et al.*, 2007) et cellules

humaines (Rothbauer *et al.*, 2006), tout en gardant une bonne spécificité. Il est donc possible d'en produire des quantités importantes pour une utilisation en immunochimie. Comme les anticorps commerciaux classiques, le fluobody pourrait reconnaître γ H2AX transféré sur membrane ou en cellules fixées, et donc être utilisé en western blot, in cell western, immunomarquage (Figure 38 D et E)... De plus, le nanobody étant directement fusionné au fluorophore, son utilisation ne nécessiterait pas d'anticorps secondaire.

Pouvoir fusionner le fluorophore de son choix au nanobody ouvre des possibilités intéressantes dans d'autres types de microscopie, comme la microscopie électronique à transmission (MET). La fixation forte requise pour la MET perturbe régulièrement la diffusibilité des anticorps et des particules d'or, rendant difficile le marquage de protéines intracellulaires. Le « MiniSOG » (*Mini Single Oxygen Generator*), est un tag de 106 acides aminés qui peut être exprimé fusionné à la protéine de son choix, comme la GFP (McIntosh *et al.*, 2011). L'avantage majeur du MiniSOG est de pouvoir observer la même protéine en fluorescence et en microscopie électronique, sans avoir à perméabiliser la cellule fixée ni utiliser d'anticorps. S'il est actuellement utilisé pour traquer des protéines, le MiniSOG fusionné à un nanobody permettrait de traquer en MET des modifications post-traductionnelles, et dans notre cas les foyers γ H2AX (Figure 38 E).

Le GFP-nanotrap (Rothbauer *et al.*, 2008) est un système capable de purifier des protéines fusionnées à la GFP, et ce, grâce à un nanobody ayant une forte affinité pour la GFP et fixé sur billes. Le même concept pourrait être appliqué pour nos nanobodies, et même amélioré. Au lieu de fixer le nanobody sur les billes après leur production, il est possible de le produire directement fusionné avec un complexe magnétique faisant office de bille : les « magnétobodies ». En effet, les bactéries de la souche *Magnetospirillum gryphiswaldense* possèdent des « magnétosomes », organites composés de cristaux de fer enveloppés d'une membrane de phospholipides et nécessaires à leur orientation sur le champ magnétique terrestre. En fusionnant un VHH à une protéine de cette membrane, il est possible d'obtenir en une purification des VHH fixés sur des magnétosomes (Pollithy *et al.*, 2011a). Ces structures sont directement utilisables pour immunoprécipiter la protéine contre laquelle est dirigée

le VHH (Figure 38 F). Ainsi, un laboratoire pourrait produire une quantité quasi illimitée de magnétobodies directement à partir de la magnétobactérie productrice.

➤ *Traqueur in vivo*

A plus long terme, des applications en modèle souris sont envisageables. Ce nanobody anti- γ H2AX, exprimé uniquement dans certains organes de souris ou dans l'animal entier, pourrait induire la dégradation de H2AX une fois phosphorylé en réponse aux CDB. Ceci est possible grâce au système deGradFP (Causinus *et al.*, 2011), décrit chez la drosophile. Brièvement, les complexes *SKP1-CUL1-F-box protein ligase* (SCFs) sont des enzymes catalysant l'ubiquitination de protéines afin d'induire leur dégradation. Elles contiennent différentes protéines F-box, permettant à SCF de se lier à des substrats spécifiques. Dans le système deGradFP, une protéine F-box (Slmb) est modifiée, et son domaine chargé de la reconnaissance du substrat est remplacé par un nanobody anti-GFP. Les protéines fusionnées à la GFP, exprimées dans ces cellules sont alors reconnues par le nanobody-slmb, ubiquitinées par le complexe SCF et adressées au protéasome pour être spécifiquement dégradées. Chez les drosophiles, H2AX est remplacé par H2AV, notre nanobody est donc inutilisable dans ce modèle. En revanche, la voie de dégradation par ubiquitination est très conservée de la mouche à l'humain, et le deGradFP fonctionne en cellules humaines (Causinus *et al.*, 2011). Par conséquent, on peut envisager d'adapter ce système en modèle souris (Figure 38 G) afin d'induire la dégradation de H2AX lorsqu'il est phosphorylé sur la sérine 139. Ce système (que l'on pourrait alors appeler « nanodegron ») représenterait une alternative au knock-out ou siRNA, qui déplètent toute la protéine H2AX et affecte alors toutes ses fonctions. Egalement, l'expression de H2AX non phosphorylable (S139A) en souris correspond très souvent à de la surexpression et peut donc biaiser les phénotypes produits. En revanche, le nanodegron ne changerait pas les taux basaux de H2AX et ne détruirait H2AX que lorsque celui-ci est phosphorylé sur la sérine 139. Il serait intéressant de constater l'effet de cette déplétion sur la signalisation des CDB, la réparation, le devenir cellulaire, la sensibilité aux radiations et le développement de cancers au niveau d'un organe ou sur l'animal entier.

Le suivi de l'efficacité d'une irradiation localisée est une problématique importante en radiothérapie, c'est pourquoi injecter des immunoconjugués anti- γ H2AX-tat pour évaluer la réponse aux radiations (Cornelissen *et al.*, 2011) (évoqué dans le chapitre II. 7) b.) constitue une stratégie innovante. Néanmoins, cet outil souffre des défauts pharmacologiques inhérents aux anticorps monoclonaux classiques. Les nanobodies injectés ont des caractéristiques pharmacologiques très prometteuses : ils bénéficient d'une bonne biodistribution, diffusent efficacement dans les tissus tumoraux tout en gardant une bonne spécificité pour leur cible (Cortez-Retamozo, 2004, Huang *et al.*, 2008). Par ailleurs, ils ne produisent pas intrinsèquement de réponse lymphocytaire B ou T, (ce qui évite d'avoir à les humaniser, contrairement aux anticorps monoclonaux de souris) et ont une demi-vie de quelques heures, ce qui réduit leur toxicité. Par conséquent, remplacer l'immunoconjugué anti- γ H2AX par un nanobody anti- γ H2AX fusionné à Tat pourrait être une amélioration sensible du procédé en termes de pharmacocinétique (Figure 38 H).

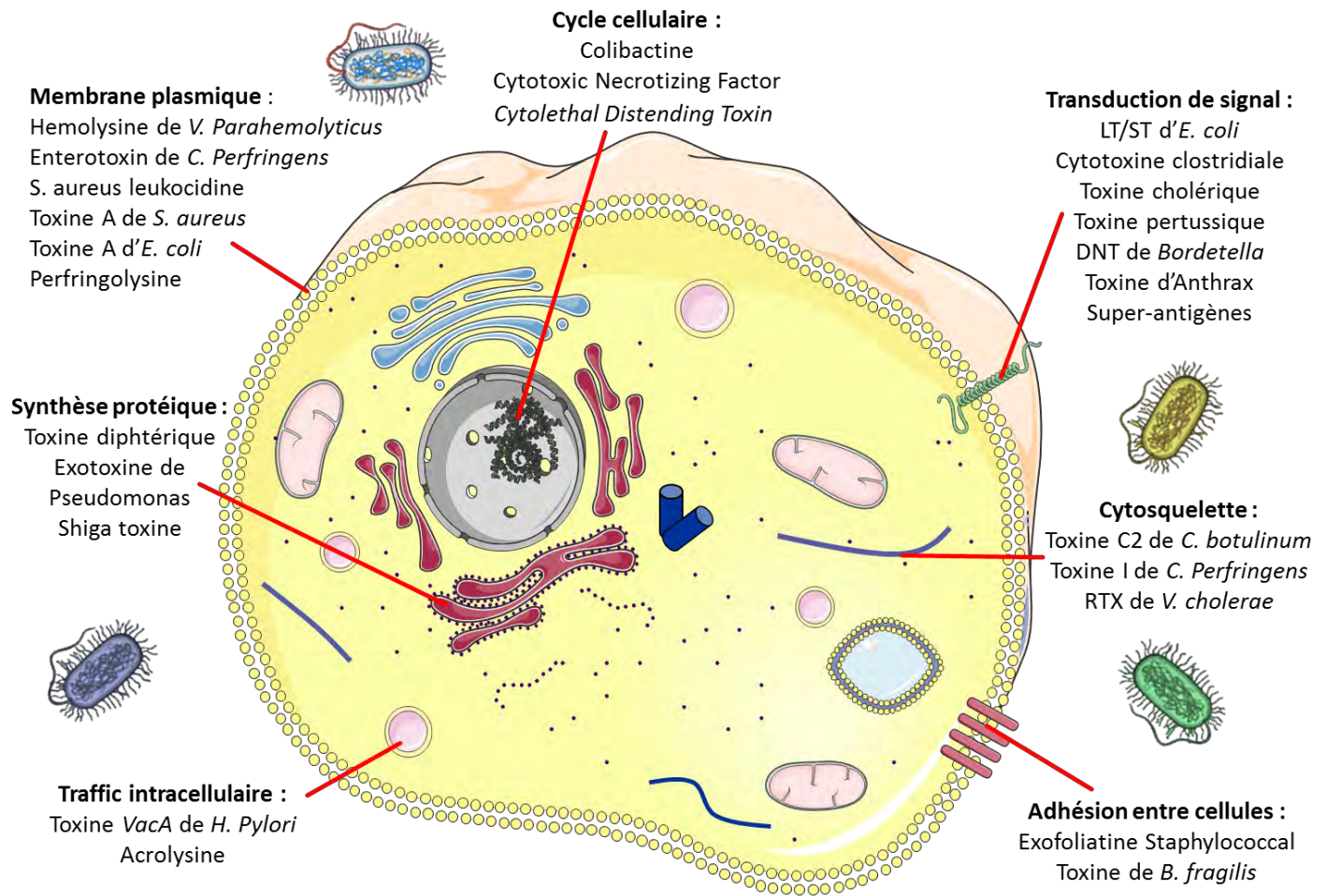


Figure 39. Les effets de toxines bactériennes sur le métabolisme cellulaire.

III. Etude d'une génotoxine : CDT

1) Les toxines bactériennes

Afin d'améliorer leur capacité à coloniser un organisme, les bactéries ont développé au cours de l'évolution des stratégies pour manipuler les fonctions des cellules hôtes pour leur propre bénéfice. Ces interactions hôtes-pathogènes passent notamment par l'expression de facteurs de virulences particuliers : les toxines bactériennes. Une fois sécrétées par les bactéries, ces toxines interfèrent avec des voies métaboliques diverses dans la cellule affectée, afin de promouvoir le développement de ces bactéries (Figure 39).

a. Les cyclomodulines

A l'instar de certains virus, une catégorie de toxines bactériennes est capable d'influer sur le cycle cellulaire des cellules hôtes : les cyclomodulines. L'infection par certaines bactéries, telles que *Helicobacter pylori*, *Bartonella spp.*, *Lwasonia intracellularis* et *Citrobacter rodentium*, peuvent induire la prolifération des cellules eucaryotes. Dans le cas de *H. pylori*, ce serait même corrélé à l'apparition de cancers (Lax *et al.*, 2002). Plusieurs toxines, comme la *Pasteurella multocida toxin* (PMT) (Rozengurt *et al.*, 1990), le cytotoxic necrotizing factor (CNF) d'*Escherichia coli* (Laufs *et al.*, 1999) et la dermonecrotic toxin (DNT) des espèces *Bordetella* (Horiguchi *et al.*, 1993), sont ainsi capables de stimuler la prolifération cellulaire. En revanche, d'autres toxines ont un effet opposé. Le *Cycle-inhibiting factor* (Cif, Marches *et al.*, 2003), la Colibactine (Nougayrede *et al.*, 2006) et la *Cytolethal Distending Toxin* (CDT, Cortes-Bratti *et al.*, 2001b) bloquent les cellules dans certaines phases du cycle. L'utilité de telles toxines pour les bactéries est plus évidente dans les zones où les cellules se répliquent de manière continue, comme par exemple l'épithélium intestinal ou les cellules du système immunitaire. En effet, ralentir le renouvellement des cellules épithéliales fournirait aux bactéries un terrain de colonisation moins hostile. Par

ailleurs, l'effet des toxines inhibitrices du cycle influencerait l'expansion clonale des lymphocytes, conférant aux bactéries de meilleures chances d'échapper aux défenses de l'hôte.

b. Les génotoxines bactériennes

Parmi les cyclomodulines, la colibactine et CDT représentent une classe à part : contrairement à la plupart des toxines bactériennes qui ciblent les protéines des cellules hôtes, l'effet sur le cycle de CDT et colibactine passe par l'endommagement de l'ADN génomique (Elwell *et al.*, 2000, Nougayrede *et al.*, 2006) : ce sont des génotoxines bactériennes.

La colibactine a été découverte récemment (Nougayrede *et al.*, 2006), et son mécanisme génotoxique est encore mal connu. Si la colibactine n'a pas pu être purifiée à l'heure actuelle, l'îlot génomique nécessaire à sa production a été identifié : l'îlot *pks*. Il code notamment pour des *non-ribosomal peptides mégasynthases* et des *polyketides mégasynthases*, constituants d'une machinerie de synthèse de composés hybrides peptide-polyketide. Ces hybrides sont retrouvés dans beaucoup de produits naturels et certains agents génotoxiques connus, tels la bléomycine. Les expériences de COMET neutres et d'analyses de la phosphorylation de γ H2AX montrent que la colibactine provoque des cassures CDB *in vivo* et active la voie de réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules humaines (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010). Par ailleurs, cette génotoxine serait capable d'induire une instabilité chromosomique, caractérisée par des polyploïdies. Cette toxine ne semble pas être sécrétée, puisque l'induction de dommages est dépendante du contact bactérie/cellule et que le surnageant seul ne produit aucun effet.

c. La Cytolethal Distending Toxin

La découverte de CDT est plus ancienne : elle a été observée chez des patients atteints de diarrhées par *Escherichia coli*, dans des surnageants d'isolats cliniques

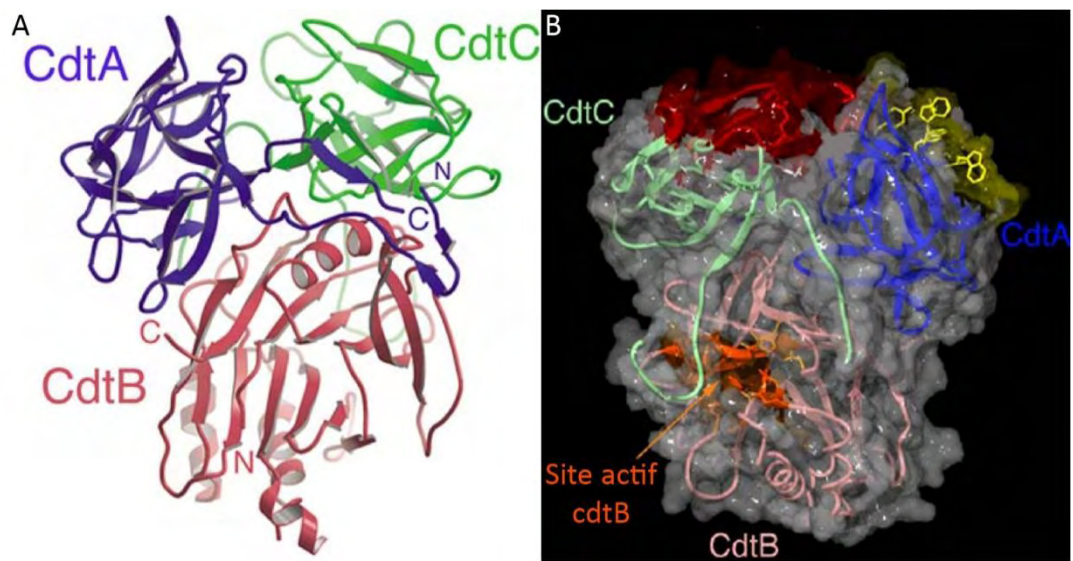


Figure 40. Structure 3D du complexe CDT.

A. Représentation tridimensionnelle des chaînes polypeptidiques (en rubans) du complexe CDT, composé des deux sous-unités régulatrices cdtA (bleu) et cdtC (vert), et de la sous-unité catalytique cdtB (Rose). N : Extrémité N-Ter ; C : extrémité C-Ter. B. Représentation 3D de CDT avec une transparence partielle de surface de la protéine, tournée de 180° selon un axe vertical par rapport à A. On peut visualiser l'extrémité N-Ter de cdtC passant dans le site catalytique de cdtB (zone orangée). Adapté de Nesic *et al.* 2004.

(Johnson *et al.*, 1988). L'expansion cytoplasmique et nucléaire progressive (Gelfanova *et al.*, 1999) des cellules de mammifères au contact de ces surnageants a été attribuée à une toxine alors nommée *Cytolethal Distending Toxin* (CDT). Les gènes codant pour ce facteur de virulence, l'îlot *cdt*, furent identifiés d'abord chez *E. coli* (Scott *et al.*, 1994), puis chez d'autres souches bactériennes gram négatives telles *Haemophilus ducreyi* (Cope *et al.*, 1997) et enfin chez des dizaines d'autres souches bactériennes d'intérêt cliniques (pour revue, Jinadasa *et al.*, 2011). Malgré des différences de séquences en acides aminés entre les différentes souches, CDT conserve la même activité biologique et la même structure : c'est une holotoxine composé de 3 sous-unités (Figure 40 A), chacune indispensable, *cdtA*, *cdtC* (sous-unités régulatrices) et *cdtB* (sous-unité catalytique) (Nesic *et al.*, 2004).

➤ Fixation de CDT à la membrane plasmique

CDT est considérée comme une toxine de type AB₂, dont *cdtA* et *cdtC* constituent les sous-unités régulatrices : elles sont nécessaires à l'entrée de *cdtB* dans la cellule cible (Cortes-Bratti *et al.*, 2000, Boesze-Battaglia *et al.*, 2009, Carette *et al.*, 2011). En effet, prétraiter des cellules avec *cdtA* et *cdtC* inhibe l'activité cytotoxique du complexe CDT, mais pas de *cdtB* seul (Deng *et al.*, 2003), signifiant que *cdtA* et C sont importants pour l'entrée *cdtB*, qui est lui-même indispensable pour l'activité de CDT. Les mécanismes et les protéines cellulaires impliquées dans l'entrée du complexe sont imparfaitement élucidés.

CdtA, *cdtB* et *cdtC* possèdent une séquence signal de sécrétion, clivée par la peptidase II au cours de la production chez la bactérie. De plus, *cdtA* possède un motif consensus de liaison aux lipides (lipobox), caractéristique récurrente des lipoprotéines membranaires de bactéries, ce qui suggère que CDT est adressé à la membrane des bactéries (Mayer *et al.*, 1999, Ueno *et al.*, 2006) puis sécrété (Figure 41 A). Les données de biochimie structurales démontrent que *cdtA* et *cdtC* partagent un domaine commun : le *ricin B lectin domain* (Nesic *et al.*, 2004). Ce domaine est connu pour interagir avec des molécules d'oligosaccharides (comme les fucoses) et est important pour l'entrée de *cdtB* dans la cellule (Figure 41 B, Nesic *et al.*, 2005). Par conséquent,

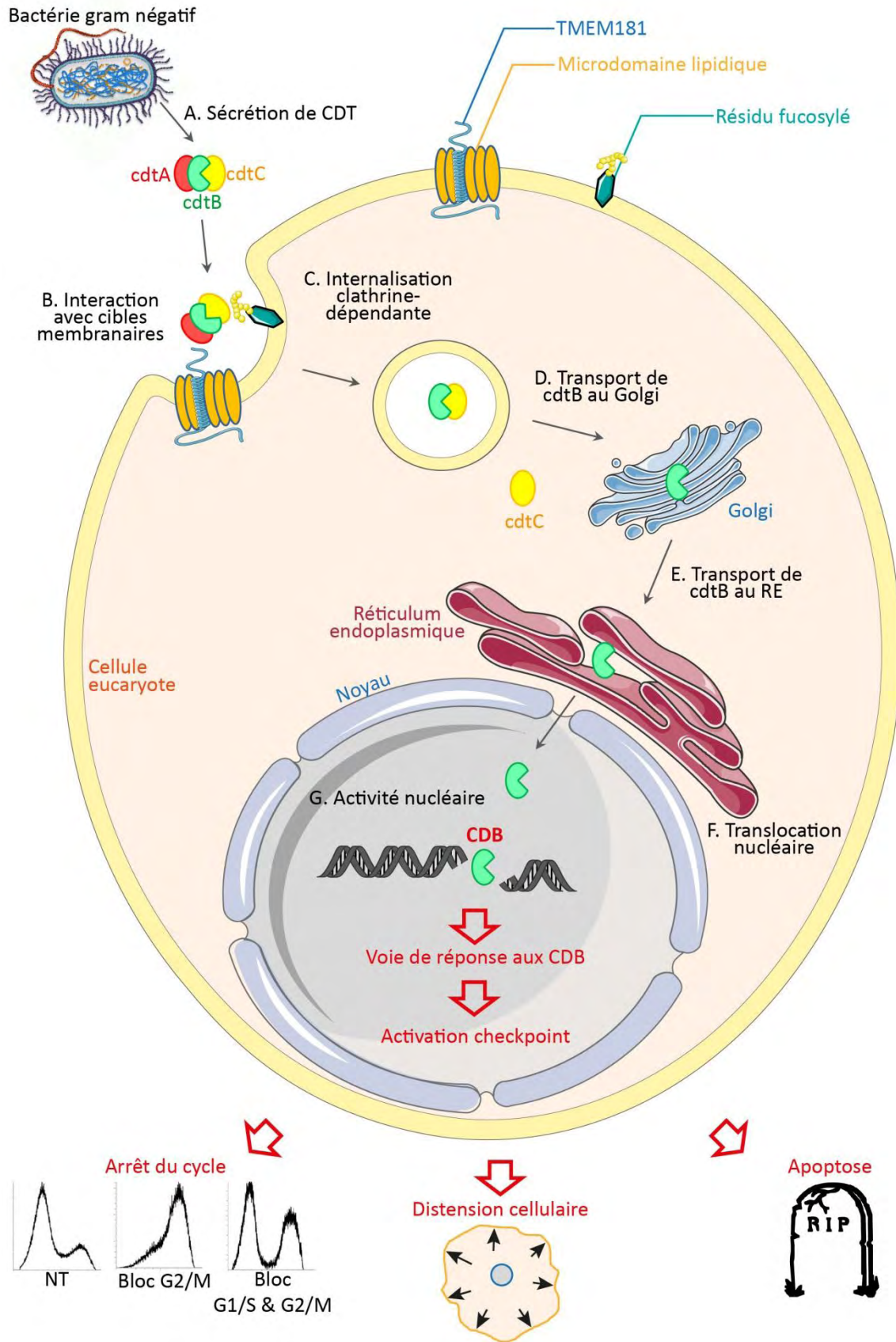


Figure 41. Modèle actuel : mécanisme d'intoxication par CDT.

on a longtemps soupçonné les résidus fucosylés de la membrane cellulaire d'être les récepteurs d'entrée de CDT. En effet, la liaison de cdtA et cdtC aux cellules est inhibée *in vitro* par compétition avec des lectines liant les résidus fucosylés (McSweeney *et al.*, 2005). Néanmoins, des travaux contradictoires minimisent l'influence du fucose dans l'entrée de CDT (Eshraghi *et al.*, 2010) et proposent un mécanisme d'entrée plus complexe et multifactoriel, pouvant impliquer des glycolipides et le contenu en cholestérol de la membrane (Figure 41 B). En effet, d'une part CDT est capable de lier le cholestérol *in vitro*, et d'autre part, CDT est localisé aux microdomaines lipidiques en immunofluorescence (Eshraghi *et al.*, 2010). Enfin, la diminution de la concentration en cholestérol contenu dans les microdomaines lipidiques membranaires inhibe l'intoxication par CDT (Boesze-Battaglia *et al.*, 2009, Boesze-Battaglia *et al.*, 2006). Plus récemment, un crible « perte de fonction », a démontré que la perte de la protéine transmembranaire couplée aux protéines G (TMEM181), rendrait les cellules insensibles à CDT (Carette *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que TMEM181 est justement localisée au niveau des rafts lipidiques.

➤ *Entrée et trafic de CDT dans la cellule*

La fixation de CDT par cdtA et C à la membrane plasmique conduit à son internalisation dans des puits recouverts de clathrine (Figure 41 C), qui peut être inhibée par des substances perturbant la formation ces puits ou inhibant la voie endosomale (Cortes-Bratti *et al.*, 2000, Guerra *et al.*, 2005a). Le suivi en temps réel de cdtA, B ou C fluorescents décrit la séparation du complexe CDT lors de son entrée dans le cytoplasme, avec cdtA restant à la membrane plasmique alors que cdtC et cdtB pénètrent dans le cytoplasme (Damek-Poprawa *et al.*, 2012). CdtB est ensuite transporté au Golgi par une voie rétrograde (Figure 41 D, Cortes-Bratti *et al.*, 2000, Guerra *et al.*, 2005b), puis au réticulum endoplasmique (Figure 41 E), pour être finalement transloqué au noyau (Figure 41 F, Damek-Poprawa *et al.*, 2012). Entre 2 et 4 heures sont nécessaires au transport nucléaire de cdtB depuis son internalisation (Damek-Poprawa *et al.*, 2012, Nishikubo *et al.*, 2003, McSweeney *et al.*, 2004), alors que cdtC persiste uniquement dans le cytoplasme. La séparation des deux sous-unités est cohérente avec les données biochimiques : effectivement, la structure 3D de CDT

montre une interaction entre les 13 acides aminés N-Terminaux de cdtC et le site catalytique de cdtB (nécessaire à l'activité cytotoxique), suggérant une fonction auto-inhibitrice de cdtC (Figure 40 B, Nesic *et al.*, 2004). Cette observation est confirmée par une baisse de l'activité catalytique de cdtB *in vitro* lorsque celui-ci est couplé à cdtC et/ou cdtA (Cao *et al.*, 2005).

Habituellement, les souches produisant CDT expriment les 3 sous-unités. Pourtant, *Salmonella enterica* serovar Typhi est une exception car elle n'exprime que cdtB, et aucun gène codant pour cdtA et C n'a pu être identifié dans cette souche (Haghjoo, 2004). Au cours de son infection, cette bactérie est internalisée dans une vacuole, et exprime cdtB couplé aux protéines PltA et PltB (*Pertussis-like toxins*) directement à l'intérieur de la cellule cible (Spanò *et al.*, 2008). Les données suggèrent que PltA et PltB permettraient à cdtB de sortir de la vacuole afin d'atteindre le noyau.

➤ Translocation nucléaire de CDT

Bien que les protéines inférieures à 40 kDa (comme cdtB, \approx 30 kDa) puissent diffuser librement à travers le pore nucléaire (Stewart *et al.*, 2001), la concentration d'une protéine au noyau nécessite un système de transport actif. La localisation de cdtB au noyau serait dépendante de séquences NLS non-consensus (*Nuclear Localization Signal*), mais des travaux contradictoires étudiant la relocalisation nucléaire de cdtB-GFP sont en désaccord quant au nombre et à la position de ces séquences : le premier travail, effectué sur un cdtB produit par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*AacdtB*, précédemment appelé *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), montre que la séquence minimale 48-124 en N-Ter est nécessaire et suffisante pour l'import de *AacdtB* au noyau, et ce de manière active (dépendante d'ATP) (Nishikubo *et al.*, 2003). Nonobstant, d'autres travaux sur cdtB d'*E. coli* démontrent la nécessité de posséder deux séquences *NLS-like* fonctionnelles situées en C-Ter (respectivement aux positions 195-210 (NLS1) et 253-268 (NLS2)) (McSweeney *et al.*, 2004). Les deux NLS sont nécessaires pour la cytotoxicité lors de l'exposition au complexe CDT complet, puisque la délétion de la NLS1 provoque une localisation périnucléaire (réticulum endoplasmique) et cytoplasmique de cdtB Δ NLS1-

GFP et la délétion de NLS2 une localisation cytoplasmique. Si l'électroporation dans le cytoplasme de *cdtB*ΔNLS1 seul ne produit aucun effet cytotoxique, l'électroporation de *cdtB*ΔNLS2 est cytotoxique. Par conséquent, *cdtB*ΔNLS2 conserve sa capacité à atteindre le noyau une fois introduit dans le cytoplasme. Pris conjointement, ces résultats proposent un rôle typique des NLS pour la NLS1, qui serait donc chargée de transloquer *cdtB* du réticulum endoplasmique au noyau. La NLS2 en revanche, serait plutôt impliquée dans le trafic intracellulaire précoce de *cdtB* (McSweeney *et al.*, 2004).

➤ *Activité génotoxique de cdtB, modèle actuel*

La présence de *cdtB* au noyau ainsi que l'activité catalytique de cette sous-unité sont essentielles à la génotoxicité et la mort induite par CDT. Selon le modèle actuel, *cdtB* provoquerait des CDB directes dans l'ADN génomique (Figure 41 G). En effet, le domaine catalytique de *cdtB* est très conservé au sein des différents CDT, et est structurellement homologue à la DNase I humaine (Elwell *et al.*, 2000, Lara-Tejero *et al.*, 2000). Des études biochimiques ont confirmé qu'il est possible d'inhiber cette activité par des mutations dans des résidus du site catalytique partagés avec la DNase I (Elwell *et al.*, 2000, Lara-Tejero *et al.*, 2000). Ces données ont permis de classer *cdtB* dans la famille des phospho-estérases dépendantes de Mg^{2+} .

In vitro, *cdtB* seul est capable de digérer un plasmide circulaire en forme relaxée ou linéarisée (Elwell *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2002, Elwell *et al.*, 2001, Mao *et al.*, 2002). Cependant, cette réaction nécessite des quantités élevées de *cdtB* (1 à 20 µg) ou des durées d'incubation importantes (de 5 à 12h), peut-être à cause de cofacteurs ou de conditions inadéquats. En effet, l'activité *in vitro* de *cdtB* n'excède pas 0,01% de celle de la DNase I (Shenker *et al.*, 2006).

In cellulo, des expériences d'électrophorèses en champ pulsé montrent qu'après environ 8 h d'incubation avec 20 µg/mL de CDT, des CDB sont détectables en cellules humaines (Frisan *et al.*, 2003). Suite aux CDB produites par CDT, la voie de réponse aux dommages dépendante d'ATM se met en place (Cortes-Bratti *et al.*, 2001b) : il y a formation de foyers RAD50 (Hassane *et al.*, 2003), γH2AX et MRE11 (Li *et al.*, 2002) en

cellules humaines. Puis les phosphorylations de CHK2 (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010, Alby *et al.*, 2001), p53 et CDC25 (Cortes-Bratti *et al.*, 2001b) conduisent à l'activation du checkpoint et l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S et/ou G2/M (Figure 41).

L'arrêt au checkpoint G1/S et G2/M semble être dépendant du statut p53 : les lignées primaires dont p53 est fonctionnel, sont bloquées en G1/S et en G2/M après exposition à CDT, tandis que la plupart des lignées cancéreuses établies, déficientes pour p53, s'arrêtent exclusivement en G2/M (Ce point est discuté dans le chapitre III. 5 b. Pour revue, Jinadasa *et al.*, 2011, Cortes-Bratti *et al.*, 2001a).

➤ CDT et mort cellulaire

Comme expliqué dans le chapitre I. 3) b., l'activation persistante des checkpoints et de p53 peut conduire à l'apoptose. Si la mort cellulaire en réponse à CDT est dépendante de l'activation de la réponse aux CDB (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010, Cortes-Bratti *et al.*, 2001b), le type de mort est largement dépendant du fond génétique du type cellulaire utilisé. Pourtant, les observations de l'activation de la réponse aux CDB et de la fragmentation nucléaire dans des lignées p53 +/+ ou p53 déficientes montrent que l'apoptose est un évènement consécutif à l'exposition de cdtB, mais qui peut être médié par des voies dépendantes ou indépendantes de p53 (Cortes-Bratti *et al.*, 2001b, Frisan *et al.*, 2003, Liyanage *et al.*, 2010, Ohara *et al.*, 2004). Par analogie avec les agents génotoxiques classiques, la littérature prédit une sensibilité accrue des cellules p53 +/+ à CDT, car plus promptes à activer l'apoptose (Gudkov *et al.*, 2003).

Pourtant, d'autres facteurs semblent dicter la sensibilité : en effet, les cellules de la lignée hématopoïétique (lymphocytes, monocytes, macrophages et cellules dendritiques) présentent non seulement une sensibilité très supérieure à CDT, mais subissent également une apoptose rapide après un court arrêt dans le cycle et sans montrer de distension (Belibasakis *et al.*, 2004, Cortes-Bratti *et al.*, 2001b, Shenker *et al.*, 2001, Shenker *et al.*, 2006). À cause de leur sensibilité accrue, les lymphocytes ont souvent été proposés comme l'une des cibles principales de CDT, on suppose que leur modulation par CDT favoriserait la colonisation de la bactérie sécrétrice. Cependant, l'origine de l'hypersensibilité de ces cellules demeure inconnue à l'heure actuelle. Elle

pourrait être liée à des variations dans la composition de la membrane, le trafic intracellulaire ou l'efficacité de la réponse aux CDB.

➤ *L'instabilité génétique induite par CDT*

A l'instar des agents génotoxiques classiques, les cellules humaines (normales ou cancéreuses) qui survivent à l'exposition de CDT présentent les caractéristiques des cellules sénescents (détectables après 6 jours). Pourtant, une étude récente montre que lors d'expositions chroniques à CDT (de 60 à 220 jours), des cellules de rats ou humaines survivantes parviennent à poursuivre leur prolifération (Guidi *et al.*, 2012). L'instabilité génomique provoquée par CDT dans ces cellules, pourrait être à l'origine de la sélection de cellules mutées, tolérantes à CDT. En effet, ces cellules sélectionnées possèdent une réponse aux CDB atténuée, ce qui pourrait leur permettre de « tolérer » l'action génotoxique de CDT, sans activer l'apoptose ou la sénescence. Ceci est cohérent avec l'accumulation de mutations et d'aberrations chromosomiques observées dans ces lignées exposées chroniquement à CDT (Guidi *et al.*, 2012).

➤ *L'action de CDT in vivo*

Malgré son potentiel génotoxique, l'expression de CDT est historiquement associée à des pathologies essentiellement infectieuses chez l'animal et l'homme. En effet, une augmentation du nombre de bactéries exprimant CDT a pu être constatée dans les fèces de patients (Albert *et al.*, 1996) ou de porcs (da Silva *et al.*, 2002) atteints de diarrhées à *E. coli*. Par ailleurs, le clonage de CDT dans une souche *E. coli* non pathogène est suffisant pour causer une diarrhée chez la souris (Okuda *et al.*, 1997). À l'inverse, l'inactivation de CDT chez une souche pathogène de *C. jejuni* conduit à une diminution de la quantité de bactéries dans le sang, foie et rate de modèles souris (Purdy *et al.*, 2000). À l'heure actuelle, aucune investigation liant l'instabilité génétique induite par CDT à un effet tumorigène sur l'homme n'a été effectuée. En revanche, l'expression de CDT dans une souche de *Helicobacter*

hepaticus induit la formation de nodules dysplasiques hépatiques (Ge *et al.*, 2007), similaires aux lésions pré-malignes d'hépatocarcinomes chez la souris (Rogers *et al.*, 2004). L'apparition de ces lésions est spécifique de l'activité catalytique de CDT, puisqu'en l'absence de *cdtB*, *H. hepaticus* colonise toujours le foie mais ne provoque plus de nodules dysplasiques (Ge *et al.*, 2007). Un autre exemple du risque carcinogène de CDT a été évoqué avec des souches de *C. jejuni* responsables de gastro-entérites chez un modèle de souris déficient pour NF-KB (Fox *et al.*, 2004). Seule l'expression de CDT avec un *cdtB* fonctionnel favoriserait non seulement la colonisation de *C. jejuni* au niveau de l'estomac et du duodenum, mais également l'apparition de plusieurs régions dysplasiques et hyperplasiques dans l'estomac et le duodenum (Fox *et al.*, 2004).

➤ *Contradictions avec le modèles actuel : problématique*

Plusieurs éléments de la littérature ne correspondent pas au modèle établi du mécanisme d'action génotoxique de CDT.

De manière intéressante, un grand nombre de lignées ont besoin de répliquer leur ADN pour s'arrêter au checkpoint G2/M en réponse à CDT (Comayras *et al.*, 1997, Sert *et al.*, 1999). En effet, des expériences de synchronisation en cellules humaines montrent que peu importe la phase du cycle dans laquelle la cellule est exposée à CDT, les cellules effectuent une nouvelle phase S avant de s'arrêter en G2. Exemple : des cellules HeLa exposées à CDT en G2 effectuent un cycle cellulaire complet avant d'être arrêté à la G2 suivante, alors que les mêmes cellules exposées à l'etoposide sont bloquées en G2/M immédiatement (Sert *et al.*, 1999). Ces résultats sont surprenants de la part d'une génotoxine produisant en théorie des CDB directes. Alternativement, ces données supposent un rôle important de la phase S dans la cytotoxicité de CDT, qui n'est pas prédit par le modèle.

La différence temporelle entre l'arrivée de CDT au noyau et l'apparition de CDB dans la cellule cible est troublante. En effet, alors que *cdtB* est capable d'atteindre le noyau en environ 3 h (Damek-Poprawa *et al.*, 2012, Nishikubo *et al.*, 2003, McSweeney *et al.*, 2004) dans la majorité des modèles cellulaires étudiés, l'apparition de CDB

détectables (soit directement, soit par des marqueurs associés) est plus tardive : de 8 à 24 h plus tard (Hassane *et al.*, 2003, Cortes-Bratti *et al.*, 2001b, Frisan, 2001, Frisan *et al.*, 2003, Bielaszewska *et al.*, 2004, Liyanage *et al.*, 2010).

Ces observations nous ont poussés à imaginer que la formation des CDB induites par CDT ne serait pas directe, et que le cycle cellulaire (particulièrement la phase S) pourrait être un facteur important pour la formation de ces CDB.

Afin de vérifier cette hypothèse et proposer un modèle plus cohérent, nous avons utilisé de faibles doses de CDT purifié (50 pg/mL), et suivi pendant 48h la cinétique d'apparition des dommages à l'ADN. En effet, de trop fortes doses (au-delà de 1 µg/mL) pourraient masquer le mécanisme réel par une toxicité trop élevée. En comparant différentes techniques de détection des dommages, nous montrons que les CDB ne sont pas le premier type de dommage qu'induit CDT d'*Escherichia coli* (EcCDT^{WT}). En effet, nos données indiquent la production par CDT de CSB qui sont ensuite converties en CDB pendant la phase S. Enfin, nous montrons que la RH prend en charge ces CDB associées à la réplication.

2) Article : Des cassures simple-brin aux cassures double-brin pendant la phase S : un nouveau mode d'action de la Cytotoxic Distending Toxin d'*E.coli*.

Article publié (CMI 12028) dans le journal *Cellular Microbiology*

(Fedor *et al.*, 2012).

From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin

Y. Fedor,^{1,2} J. Vignard,^{1,2} M.-L. Nicolau-Travers,^{1,2} E. Boutet-Robinet,^{1,2} C. Watrin,^{3,4,5,6} B. Salles^{1,2} and G. Mirey^{1,2*}

¹INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France.

²Université de Toulouse, UPS, UMR1331, Toxalim, F-31062 Toulouse, France.

³INRA, USC 1360, F-31300 Toulouse, France.

⁴Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), F-31400 Toulouse, France.

⁵Inserm, UMR1043, F-31300 Toulouse, France.

⁶CNRS, UMR5282, F-31400 Toulouse, France.

Summary

The Cytolethal Distending Toxin (CDT) is a genotoxin produced by several pathogenic bacteria. It is generally admitted that CDT induces double-strand breaks (DSB) and cell cycle arrest in G2/M-phase, in an ATM-dependent manner. Most of these results were obtained at high dose (over 1 µg ml⁻¹) of CDT and late after treatment (8–24 h). We provide here evidence that the *Escherichia coli* CDT (EcCDT) – at low dose (50 pg ml⁻¹ or LD50) and early after treatment (3–6 h) – progressively induces DNA DSB, mostly in S-phase. DSB formation is related to the single-strand breaks induction by CDT, converted into DSB during the S-phase. We also show that homologous recombination is mobilized to these S-phase-associated DSB. This model unveils a new mechanism for CDT genotoxicity that may play a role in cells partly deficient in homologous recombination.

Introduction

The Cytolethal Distending Toxin (CDT) has been discovered in culture filtrates obtained from bacterial strains causing diarrhoea (Johnson and Lior, 1988). CDT is

produced by many bacteria (reviewed in Smith and Bayles, 2006; Jinadasa *et al.*, 2011) and considered as a virulence factor. Historically, the toxin name is directly linked to its effect on mammalian cells since CDT induces progressive nuclear and cytoplasmic distension leading to cell cycle arrest (Peres *et al.*, 1997; Sugai *et al.*, 1998) and cell death (Gelfanova *et al.*, 1999). Despite notable diversity in sequence relatedness among known CDTs, all share the same apparent biological activity and structure. Typically, CDTs are heterotrimeric holotoxins composed of two binding subunits, cdtA and cdtC, and a catalytic subunit cdtB (Nesic *et al.*, 2004). Once internalized, cdtB is addressed to the nucleus, where it performs its cytotoxic activity (see Nishikubo *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2011 for review). Numerous lines of evidence indicate that genomic DNA is the target of cdtB. First, cdtB belongs to the DNase I Mg²⁺-dependent phosphoesterase family, due to a strong structural homology in the catalytic domain (Elwell and Dreyfus, 2000). Second, CDT mechanism of action was unravelled by biochemical studies showing that cdtB possesses a nuclease activity that can be disrupted by mutations of critical residues in the catalytic domain (Elwell and Dreyfus, 2000; Lara-Tejero and Galan, 2000). *In vivo*, Pulse Field Gel Electrophoresis experiments have shown DNA double-strand breaks (DSB) induction in HeLa cells exposed to *Haemophilus ducreyi* CDT (Frisan *et al.*, 2003). These data support the model of an induction of DNA damage responsible for CDT cytotoxicity.

In response to the production of DSB by CDT, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) initiates DNA damage checkpoints and phosphorylates H2AX, an H2A histone variant (called γH2AX once phosphorylated) around DSB site (Cortes-Bratti *et al.*, 2001). Additionally, MRE11 (Li *et al.*, 2002) and RAD50 (Hassane *et al.*, 2003) are recruited to the lesion. Then, the phosphorylation of CHK2 (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010), p53 and CDC25 lead to checkpoint activation and cell cycle arrest in G1/S and/or G2/M (Cortes-Bratti, 2000). These checkpoints induce transient cell cycle arrests, allowing sufficient time for DNA repair. Two well-known pathways are responsible for DSB repair: the Non-Homologous End Joining (NHEJ), which is the main pathway in higher eukaryote, and the Homologous Recombination (HR) which restores the

Received 30 May, 2012; revised 4 September, 2012; accepted 5 September, 2012. *For correspondence. E-mail gladys.mirey@toulouse.inra.fr; Tel. (+33) 561 285 156; Fax (+33) 561 285 310.

2 Y. Fedor et al.

original DNA sequence using undamaged template DNA. Whereas NHEJ repairs DSB in all phases of the cell cycle, HR is dependent on the presence of a homologous DNA template and, thus, is generally limited to S- and G2-phases (for review, see Ciccio and Elledge, 2010; Symington and Gautier, 2011).

On the other hand, few reports disagree on the current model of a direct induction of DSB leading to cell cycle arrest and apoptosis, and favour the opposite mechanism where DNA fragmentation is a consequence of the induction of cell cycle arrest and apoptosis (Elwell and Dreyfus, 2000; Frisan *et al.*, 2002; Shenker *et al.*, 2006). These opposite mechanisms could also be explained by the use of different cell systems in these studies. In this respect, the fact that many cell lines need the progression of DNA replication through S-phase to be blocked at the following G2/M checkpoint (Comayras *et al.*, 1997; Sert *et al.*, 1999), supports an alternative model where S-phase plays a key role in CDT genotoxicity. Indeed, there seems to be several hours delay between the *cdtB* entry in the nucleus (Nishikubo *et al.*, 2003) and the induction of detectable DSB (Frisan *et al.*, 2003) or DSB signalling pathway activation (Frisan, 2001; Frisan *et al.*, 2003; Hassane *et al.*, 2003; Bielaszewska *et al.*, 2004; Liyanage *et al.*, 2010). This delay led us to wonder if DSB formation was direct or could derive from the presence of single-strand breaks (SSB). In order to question this hypothesis, we used a low dose of CDT (50 pg ml⁻¹ or LD50) and followed for 48 h the kinetic of DNA damage occurrence, since the mechanism of conversion between SSB to DSB might be hidden by a high toxic dose (over 1 µg ml⁻¹). Here we show that the *Escherichia coli* CDT (EcCDT), at low dose (50 pg ml⁻¹ or LD50) and early after treatment (between 3 and 6 h), induces DSB mostly in S-phase. We gather information on the production of CDT-induced SSB, later converted into DSB during the S-phase. Finally, we show that homologous recombination is linked to these S-phase-associated DSB. Our model unveils a new mechanism for CDT genotoxicity that may play a role in cells partly deficient in homologous recombination.

Results

DSB are progressively induced after CDT exposure

CDT is known to induce direct DSB in mammalian cells, leading to cell death (Cortes-Bratti *et al.*, 2001). In order to assess the biological activity of purified EcCDT^{WT} (wild-type CDT-I from *E. coli*), HeLa cells were incubated in the presence of increasing concentrations of purified protein: LD50 (50 pg ml⁻¹: lethal Dose 50, killing 50% of HeLa cells after 72 h of EcCDT^{WT} treatment), LD75 (2.4 ng ml⁻¹) and LD95 (25 ng ml⁻¹). To analyse DSB induction in response

to CDT, we followed the behaviour of two DSB markers: γH2AX and p53 Binding Protein 1 (53BP1). γH2AX and 53BP1 are both mediators of DSB DNA damage response that early form foci around the DSB site. H2AX is an H2A histone variant phosphorylated at its C-terminus, on several megabases around the DSB within minutes after the DSB induction (Rogakou *et al.*, 1998) and, once phosphorylated, is called γH2AX. 53BP1 is then quickly recruited around the DSB site and is involved in p53 regulation and checkpoint activation (Schultz *et al.*, 2000). We chose the same treatment period by CDT than reported for *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans cdtB*, which reach the nucleus of HeLa cells within 3 h (Nishikubo *et al.*, 2003). Following the treatment by different concentrations of purified EcCDT^{WT}, we analysed the formation of 53BP1 and γH2AX foci in HeLa cells (Fig. 1A), defining cells as positive if more than five foci per nuclei were detected. After 3 h, we did not observe DSB induction in cells exposed to the EcCDT^{WT} LD50 (50 pg ml⁻¹), compared with the untreated control cells, whereas 33% and 51% positive cells were counted at LD75 (2.4 ng ml⁻¹) or LD95 (25 ng ml⁻¹) (Fig. 1B). Interestingly, in the case of the lower dose (LD50), the positive γH2AX labelling is delayed to 6 h in contrast to higher doses (Fig. 1B and C). Similarly 53BP1/γH2AX-positive cells are detectable after 6 h of treatment and their number increases progressively after 9 h (20–22% of 53BP1/γH2AX-positive cells), reaching 29–33% at 24 h and about 60% after 48 h of treatment (Fig. 1C). The same experiment was performed with a mutated CDT (EcCDT^{H153A}) in which the histidine 153, crucial for the nuclease activity of *cdtB*, is replaced by an alanine (Elwell and Dreyfus, 2000; Taieb *et al.*, 2006). This mutation is known to disrupt *cdtB* activity *in vitro* and *in vivo* (Elwell and Dreyfus, 2000; Lara-Tejero and Galan, 2000). EcCDT^{H153A} did not induce DSB for the same times of treatment (Fig. 1C) meaning this effect is specific to the *cdtB* activity.

The number of damaged cells increasing progressively over time, this suggests that EcCDT^{WT} does not simultaneously affect all cells. Moreover, the differences in DNA damage responses at 3 h and 6 h after treatment, for the same dose (LD50), evoke a more complex mechanism for CDT genotoxicity than a direct DSB activity and may involve other DNA damage.

CDT induces early DNA damage and single-strand DNA accumulation before DSB formation

To assess if other CDT damage are achieved between 3 h and 6 h, alkaline COMET assays were performed on HeLa cells exposed to EcCDT^{WT} or EcCDT^{H153A}. This technique reveals SSB, DSB and alkali-labile sites (Fairbairn *et al.*, 1995). Interestingly, we observed a significant

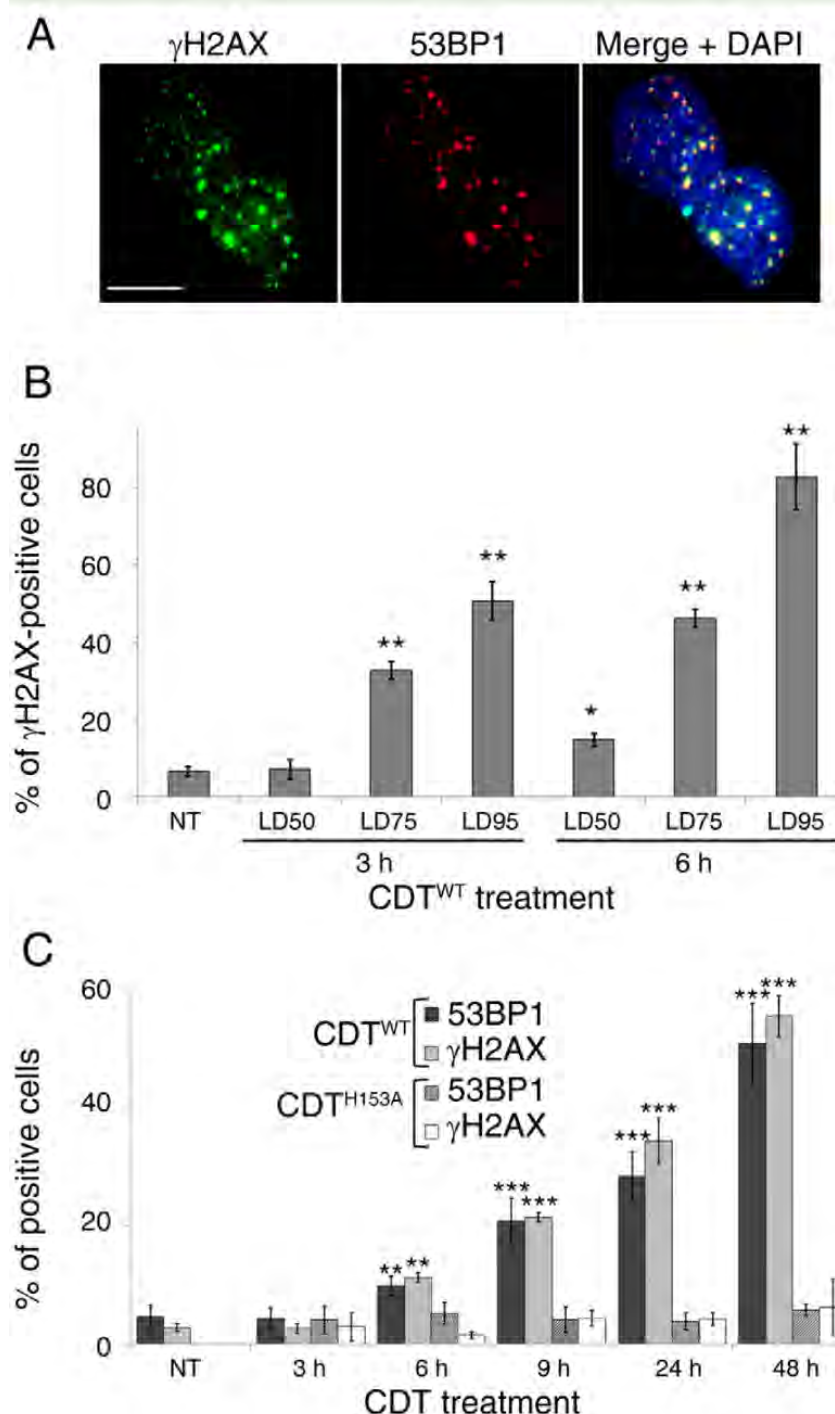


Fig. 1. DSBs are progressively induced after CDT exposure.

A. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} for 24 h and DSBs were detected by γ H2AX (green) and 53BP1 (red) immunostaining. Scale bar = 20 μ m.

B. Quantification of HeLa cells positive for γ H2AX foci formation after EcCDT^{WT} exposure for 3 h or 6 h and for the following concentrations: LD50 (50 μ g ml⁻¹), LD75 (2.4 ng ml⁻¹), LD95 (25 ng ml⁻¹). Results obtained from three independent experiments. Error bars, SD; * P < 0.05, ** P < 0.01.

C. Quantification of HeLa cells positive for 53BP1 and γ H2AX foci formation after EcCDT^{WT} at LD50 (50 μ g ml⁻¹) or EcCDT^{H153A} exposure for the indicated times. Cells were scored positive for foci formation when > 5 foci/nuclei were detected. n = 9 for 53BP1 staining, n = 6 for γ H2AX staining; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

increase of DNA damage in all cells, as soon as 3 h after exposure to low dose of EcCDT^{WT} (50 μ g ml⁻¹) but not EcCDT^{H153A} (Fig. 2A and B). These results, with the absence of DSB at 3 h, clearly show that EcCDT^{WT} induces other DNA damage prior to DSB. These early EcCDT^{WT}-induced DNA damage could be the cause of DSB observed later, as several studies underlined the necessity of the S-phase for CDT-induced G2 block and cytotoxicity (Comayras *et al.*, 1997; Sert *et al.*,

1999). Indeed, DSB may be formed by the conversion of unrepaired SSB blocking the progression of the replicative fork (Pascucci *et al.*, 2005). To test this hypothesis, we took advantage that, when a stress causes the replication to stall (e.g. a DNA damage), replication helicases keep on unwinding DNA and reveal single-strand DNA (ssDNA) coated by Replication Protein A (RPA) (Feng *et al.*, 2011). We therefore analysed replication stresses by determining the presence of RPA foci by immunostain-

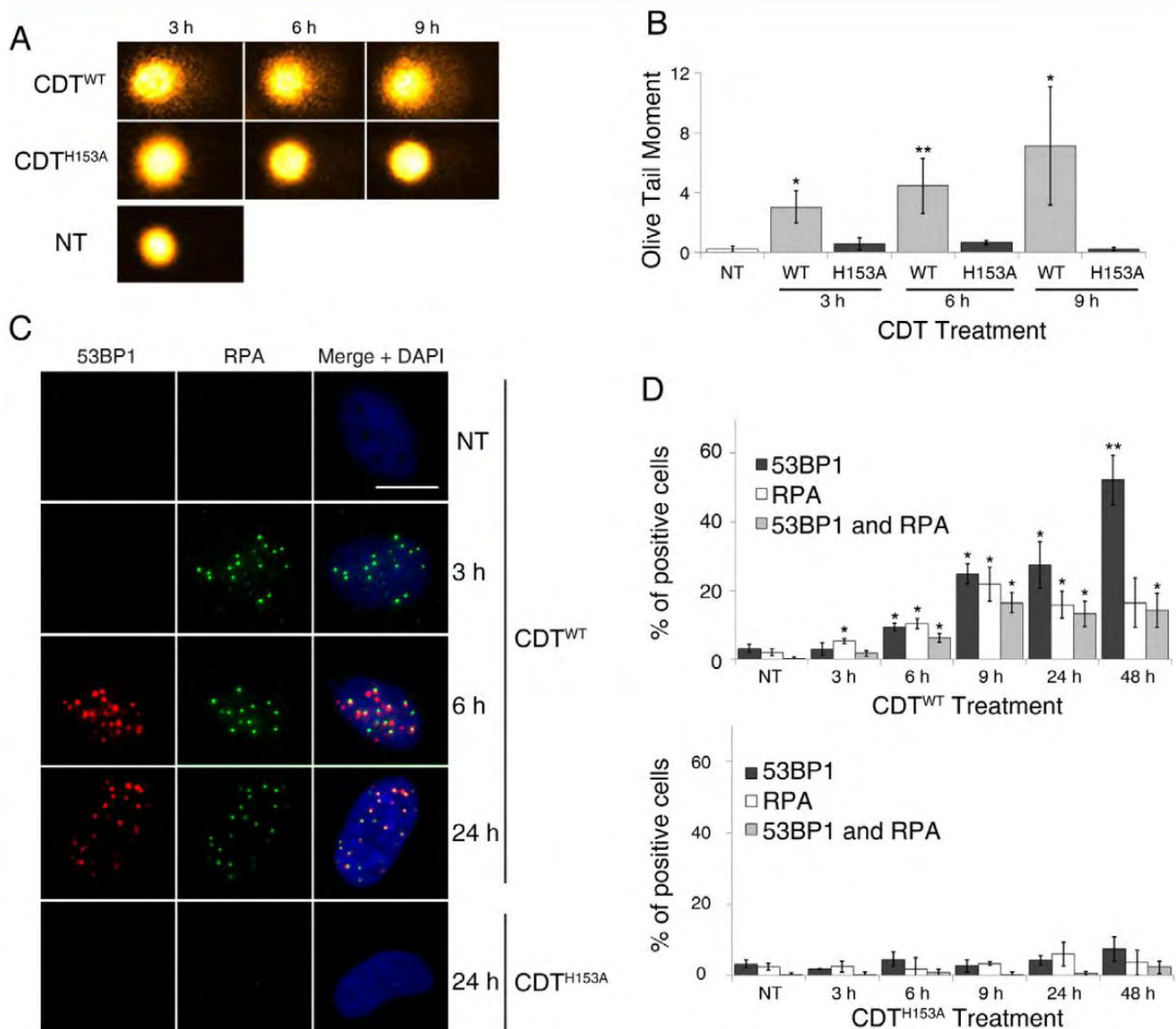


Fig. 2. CDT induces DNA damage and ssDNA accumulation before DSB formation.

A. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 or EcCDT^{H153A} for the indicated times and DNA damage are evaluated with alkaline COMET assays.

B. Olive tail moment of cells exposed to EcCDT^{WT} LD50 or EcCDT^{H153A} for the indicated times. $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

C. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 or CDT^{H153A} for indicated times and stained with 53BP1 (red) and RPA (green) antibodies. Scale bar = 20 μm .

D. Quantification of HeLa cells positive for 53BP1 foci formation (dark grey bars), RPA foci formation (white bars) or both (light grey bars) after EcCDT^{WT} LD50 or EcCDT^{H153A} exposure for the indicated times. Cells were scored positive for foci formation when > 5 foci/nuclei were detected. $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

ing, in EcCDT^{WT} or EcCDT^{H153A}-exposed cells (Fig. 2C). Significantly, exposed cells display RPA foci after 3 h of treatment, even before 53BP1 foci appearance (Fig. 2C and D). Additionally, almost all RPA foci and 53BP1 foci colocalize after 6 h of EcCDT^{WT} treatment, suggesting a functional link between these two markers. Finally, we observed that while 53BP1-positive cells increase over time, RPA-positive cells number decreased after 9 h. Taken together, these results indicate that CDT induces a

yet undescribed DNA damage, driving to accumulation of ssDNA, followed by DSB formation.

CDT-induced DSB are correlated with cell cycle

Because of ssDNA accumulation in response to CDT, we hypothesize that S-phase could play a role to convert CDT-induced SSB into DSB. Moreover, as S-phase always seemed to represent an important step of CDT

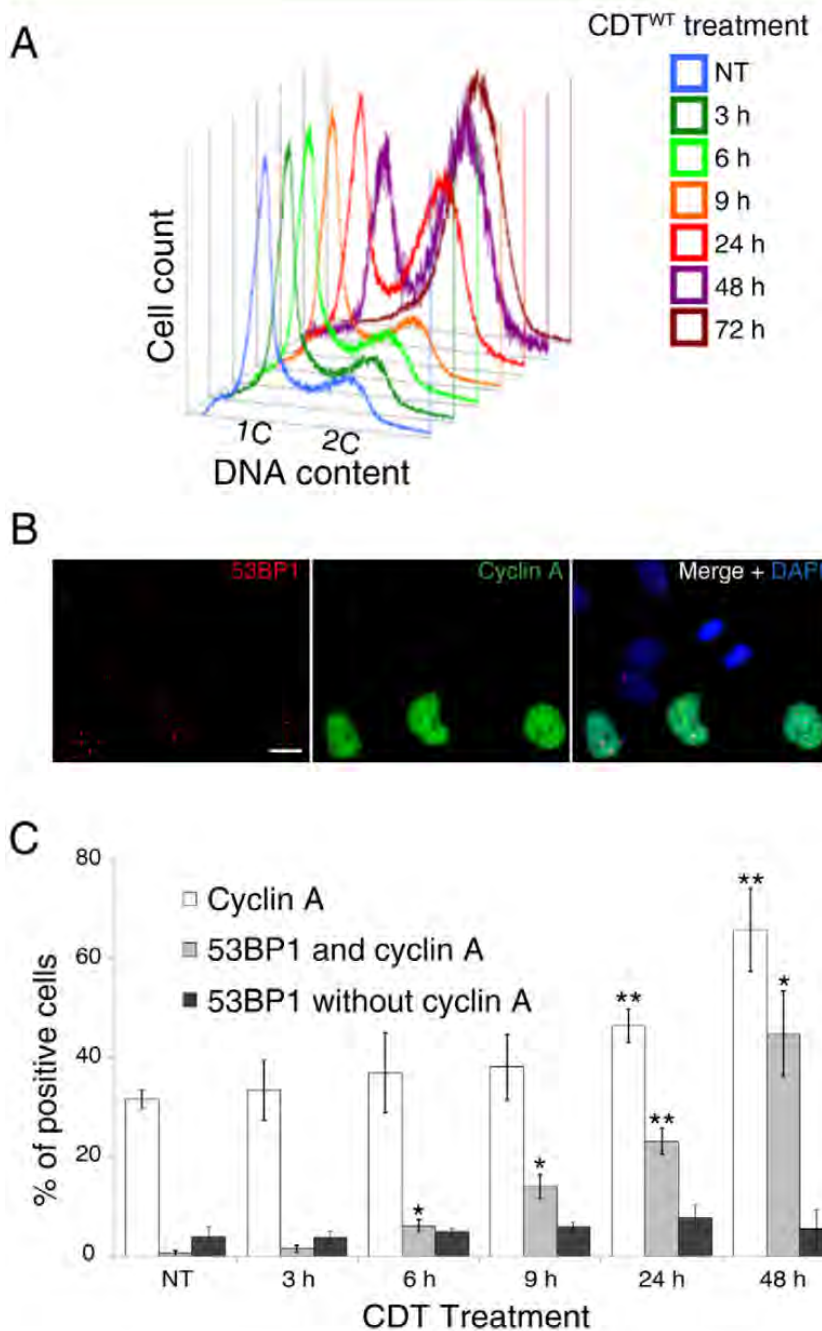


Fig. 3. CDT-induced DSB are correlated with cell cycle.

A. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 for the indicated times and stained with propidium iodid. HeLa cell-cycle distribution analysis was performed by flow cytometry. Peaks corresponding to cells in G1 (DNA content 1C) or in G2 (DNA content 2C) phase are indicated.

B. HeLa cells were exposed to CDT^{WT} LD50 for 24 h and stained with 53BP1 (red) and cyclin A (green) antibodies. Scale bar = 20 μ m.

C. Quantification of HeLa cells positive for cyclin A staining (white bars), 53BP1 foci formation in cyclin A positive cells (light grey bars), or 53BP1 foci formation in cyclin A negative cells (dark grey bars) after EcCDT^{WT} LD50 exposure for the indicated times. Cells were scored positive for foci formation when > 5 foci/nuclei were detected. $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

cytotoxicity (Comayras *et al.*, 1997; Sert *et al.*, 1999), we analysed the correlation between DSB appearance and cell cycle phases in response to CDT. As shown in Fig. 3A, the LD50 concentration of EcCDT^{WT} provokes a G2 block after 24 h of treatment, the block being total after 72 h. These data are coherent with a significant increase of cyclin A-positive cells detected by immunofluorescence after a 24 h EcCDT^{WT} treatment (Fig. 3B and C) (Comayras *et al.*, 1997), since this labelling represents a well-known marker of S- and G2-phases (Hochegger *et al.*, 2008). Interestingly, we showed that

53BP1 foci appear mostly in cyclin A-positive cells: among 53BP1-positive cells 56% are also cyclin A-positive at 6 h, 70% at 9 h and 75% at 24 h. These data suggest that EcCDT^{WT}-induced DSB are mainly produced during the S-G2-phases of the cell cycle.

In the HT1080 cell line, displaying a wild-type p53 and a functional G1/S arrest (Pellegata *et al.*, 1996), EcCDT^{WT} LD50 treatment clearly induces both G1/S and G2/M blocks (Fig. S1A). In accordance with the G1/S checkpoint activation, no cyclin A staining increase could be observed after 24 h or 48 h of EcCDT^{WT} LD50 treatment

6 Y. Fedor et al.

Fig. 4. CDT induces replication-associated DSB and perturbs S-phase progression.

A. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 or EcCDT^{H153A} for the indicated times and stained with 53BP1 (red) and PCNA (green) antibodies. Scale bar = 20 μ m.

B. Quantification of HeLa cells positive for PCNA pan staining (early S-phase cells, dark grey bars) or PCNA foci staining (late S-phase cells, light grey bars) after EcCDT^{WT} LD50 or EcCDT^{H153A} exposure for the indicated times. Cells were scored positive for PCNA foci when distinguishable foci could be observed, and PCNA pan staining positive when PCNA stained uniformly the nucleus.

C. Quantification of HeLa cells positive for 53BP1 foci formation after EcCDT^{WT} LD50 or EcCDT^{H153A} exposure for the indicated times. Cells were scored positive for 53BP1 foci formation when > 5 foci/nuclei were detected in cells positive for PCNA foci staining (light grey bars), in cells positive for PCNA pan-nuclear staining (dark grey bars) or in cells negative for PCNA staining (white bars). $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

D and E. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 for the indicated times and stained with 53BP1 and cyclin B1 antibodies. According to the cyclin B1 staining, cells in S-phase, G2-phase or mitosis are quantified (D, as described in Fig. S2C and D). Quantification of HeLa cells positive for 53BP1 foci formation after EcCDT^{WT} LD50 exposure for the indicated times (E). Cells were scored positive for 53BP1 foci when > 5 foci/nuclei were detected in cells in S-phase (grey bars), G2-phase (white bars) or mitosis (dark grey bars) according to the cyclin B1 staining. $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

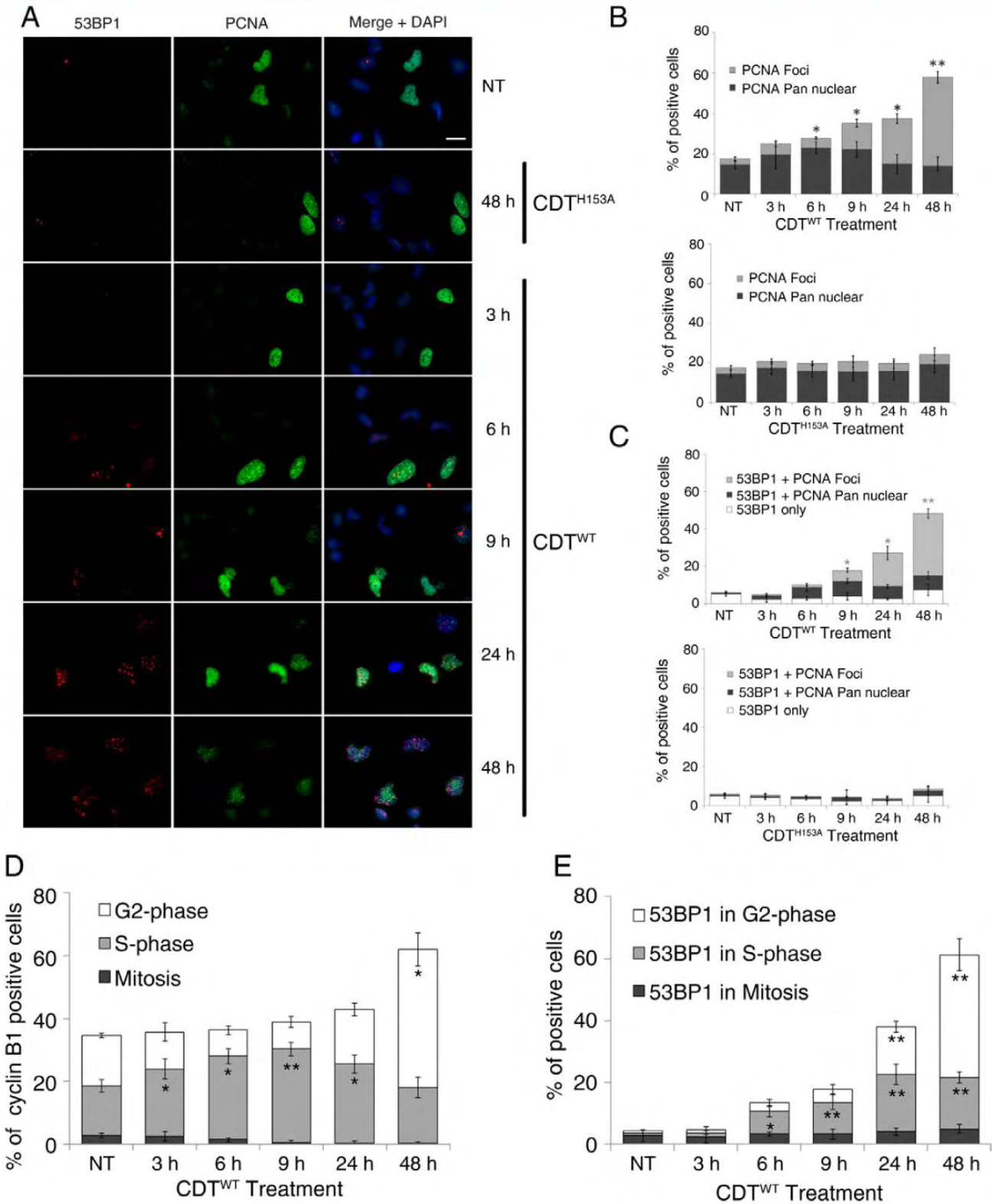
(Fig. S1B). Such G1-arrested cells do not accumulate DSB as 53BP1 foci form mainly in cyclin A positive cells (Fig. S1B, 24 h and 48 h). These data suggest that, even in cells displaying an active G1/S checkpoint, EcCDT^{WT}-induced DSB are mainly produced during the S-G2-phases of the cell cycle, reinforcing the role of the S-phase to transform CDT-induced damage into DSB.

CDT induces replication-associated DSB and perturbs S-phase progression

53BP1 and cyclin A co-staining suggests that DSB occur during either the S- and/or G2-phase. To discriminate between these two possibilities, we stained EcCDT^{WT} and EcCDT^{H153A} exposed HeLa cells with an anti-PCNA antibody. PCNA is a specific actor of the S-phase, involved in the recruitment of DNA polymerases δ/ϵ during replication. After release of a G1/S synchronization, early S-phase cells exhibits a PCNA pan nuclear staining until mid-S-phase (0–3 h), this staining being progressively converted into foci in late S-phase cells (3–6 h) and disappearing after completion of DNA replication (Bravo and Macdonald-Bravo, 1987), as shown in Fig. S2A and B. We observed that the total number of PCNA-positive cells increases significantly after 6 h of treatment with the EcCDT^{WT} (28% of PCNA-positive cells) but not with the mutant toxin (Fig. 4A and B). The proportion of PCNA-positive cells increases from 35% at 9 h to 37% at 24 h and 58% at 48 h of EcCDT^{WT} treatment. These results demonstrate that EcCDT^{WT} treatment leads to a lag in S-phase as soon as 6 h, even though this could not be detected by flow cytometry (Fig. 3A). Among these PCNA-positive cells, we were able to discriminate between early/mid S-phase cells and mid/late S-phase cells based on evolving PCNA staining patterns. Until 6 h of EcCDT^{WT} treatment, S-phase cell accumulation first occurs in early S-phase, then the number of late S-phase cells increased after 9 h, and became predominant after 24 h (Fig. 4B). Indeed, more than 60% of PCNA-positive cells are in late S-phase (or

G2, see later) at 24 h of EcCDT^{WT} treatment, and more than 75% after 48 h of treatment. Whether the S-phase lag is linked to DSB occurrence has been assessed by anti-53BP1 and anti-PCNA co-staining of EcCDT^{WT} or EcCDT^{H153A}-treated cells (Fig. 4A and C). We observed that DSB arose first in cells in early S-phase (6 h and 9 h of treatment) and then accumulated mostly in late S-phase cells at later time points (9 h, 24 h and 48 h) (Fig. 4C).

After EcCDT^{WT} treatment in HeLa cells, the content in G2 cells increases at 24 h and 48 h, being total at 72 h (Fig. 3A). This is supported by the cyclin A staining, showing 46% and 66% of S/G2 cells at 24 h and 48 h respectively (Fig. 3C). At the same time, Fig. 4B shows that S-phase cells are almost representing 37% to 57% at 24 h and 48 h after treatment, as inferred by PCNA staining. In order to clarify this point and decipher if HeLa cells accumulate in late S-phase and/or G2-phase, we used the cyclin B1 as a cell cycle marker. Cyclin B1 is differentially expressed and localized during the cell cycle and allow to accurately discriminate between S-phase, G2-phase and Mitosis (Pines and Hunter, 1991; Katula *et al.*, 1997; Dalal *et al.*, 1999; Frisa and Jacobberger, 2009 and Fig. S2C and D). Early after EcCDT^{WT} exposure (3 h, 6 h and 9 h), we show a slight but significant increase of the S-phase cells content, associated with a decrease of the G2 cells content (Fig. 4D). Later, at 24 h and 48 h, the S-phase content decreases (25% to 18%) as the G2 content increases (17% to 44%) (Fig. 4D), supporting that EcCDT^{WT} treatment first induces a S-phase lag that eventually leads to a G2 arrest. Thus, the PCNA foci staining observed at late points after the EcCDT^{WT} treatment (24 h and 48 h, Fig. 4A and B) most probably represent damaged G2 cells rather than late S-phase cells, as confirmed with the cyclin B1 staining (Fig. 4D and see *Discussion* for details). These data suggest that CDT-induced SSB are converted to DSB during DNA replication, therefore perturbing S-phase completion and progressively inducing damaged G2 cells accumulation (Fig. 4E).



Homologous recombination is crucial to repair CDT-induced DNA damage

It is important to note that the RPA-positive cells proportion decreases after 9 h (Fig. 2C and D). This can be explained if CDT-induced DSB are processed by repair mechanisms. Indeed, RPA is displaced from ssDNA during homologous recombination (HR) to allow RAD51 nucleofilament formation (reviewed in Krejci *et al.*, 2012). To test if HR is involved in the repair of EcCDT^{WT}-induced DSB, we therefore analysed the recruitment of RAD51 after EcCDT^{WT} or EcCDT^{H153A} treatment by immunofluorescence (Fig. 5A). Interestingly, nearly all cells displaying DSB show colocalization between γ H2AX and RAD51 foci (Fig. 5A and B), implying that HR machinery is mobilized to EcCDT^{WT}-induced DSB. To investigate the requirement of HR for cell survival after EcCDT^{WT} exposure, we inhibited HR by siRNA knock-down of RAD51 (Fig. 5C). Twenty-four hours after siRNA transfection, HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} or EcCDT^{H153A} for indicated concentrations for 72 h. Clearly, HR-deficient cells were dramatically more sensitive to CDT exposure compared with control cells, even at very low doses of EcCDT^{WT} (Fig. 5D). These data demonstrate the importance of HR for cells to deal with and survive EcCDT^{WT}-induced DSB.

Discussion

CDT is reported to induce direct DSB in mammalian cells, leading to activation of an ATM-dependent G2/M checkpoint (Cortes-Bratti, 2000; Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010). Although some evidence supporting a CDT-mediated intra-S-phase checkpoint exists in yeast, the study of this mechanism in mammalian cells is still lacunar, even though several studies demonstrated the necessity of the S-phase for CDT to induce this G2/M block (Comayras *et al.*, 1997; Sert *et al.*, 1999). Nevertheless, data are still lacking to explain why direct DSB may need DNA replication to induce an ATM-dependent checkpoint activation. Here, we used HeLa cells, known to be p53 defective, as they have been widely used for CDT studies and present a G2/M checkpoint after CDT treatment, and we report a mechanism intrinsically linked to the S-phase. Our study contributes to a better understanding of the cdtB genotoxicity in human cells. To our knowledge, this is the first time that the dynamic of cellular DNA damage response to CDT exposure is analysed.

First, we observed no induction of DSB for the CDT LD50 (equivalent to 50 pg ml⁻¹) after 3 h of treatment compared with higher doses. DSB-damaged cells were only detectable after at least 6 h of treatment and the number of damaged cells increased progressively (Fig. 1). Interestingly, after 9 h, the number of γ H2AX foci/nuclei seems constant (around 20 foci per affected cell,

data not shown). Since CDT induces lesions that can be revealed by alkaline COMET assay as soon as 3 h after treatment, that is to say before γ H2AX detection, these lesions must be alkali-labile sites or SSB. We therefore demonstrate that CDT induces other type of DNA damage before DSB (Fig. 2), which are specific to cdtB catalytic activity since no damage is detected with the mutant version of cdtB. It has been shown that cdtB possesses a catalytic domain homologue to Mg²⁺-Dependent Phosphoesterase superfamily (Elwell and Dreyfus, 2000; Lara-Tejero and Galan, 2000). DNases from this superfamily, like human DNase I, can hydrolyse phosphate from one or two DNA strands, depending on the conditions, cofactors and incubation time (Pan *et al.*, 1998), resulting on SSB and/or DSB DNase activity. Moreover, *in vitro* assays demonstrated that EcCDT DSB DNase activity is less than 0.01% of the mammalian DNase I (Elwell *et al.*, 2001). Altogether, these data strongly suggest that CDT-induced DNA damage at early times represent SSB. Therefore, high concentrations of purified CDT used in previous studies, often beyond 1 μ g ml⁻¹ (at least 10 times more concentrated than the LD95 and 5 \times 10⁵ times more than the LD50 determined in this study), may have led to accumulation of SSB, potentially causing direct DSB when numerous SSB are facing each other on different DNA strands (Freifelder and Trumbo, 1969). Actually, we detected DSB as early as 3 h of CDT treatment only for high doses (LD75 equivalent to 2.4 ng ml⁻¹ and LD95 equivalent to 25 ng ml⁻¹), but only few of them showed RAD51 foci (Fig. S3). We infer that in these conditions, CDT induces direct DSB (S-phase independent) that will be mostly repaired by NHEJ, since HR is mostly efficient in S- and G2-phases. In opposition, low dose of CDT (in our conditions, LD50 equivalent to 50 pg ml⁻¹) causes indirect DSB (S-phase dependent) at later times, these being repaired by HR.

Second, because of affected cells accumulation over time (Fig. 1), it seems that DSB induction is not simultaneous in all CDT-exposed cells at LD50, what would be expected from a direct DSB DNase activity. Because S-phase has often been considered as a crucial step for CDT-induced G2/M checkpoint (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010), we analysed the impact of low CDT dose (LD50) on the cell cycle and on the DSB accumulation. Although low dose of CDT induced a S-phase lag in exposed cells that could not be detected by flow cytometry, we were able to reveal this lag with immunofluorescence staining by analysing the PCNA behaviour. Indeed, because the patterns of PCNA staining are evolving along the S-phase, it is an efficient tool to accurately discriminate late G1 from early S cells and late S from G2 cells. In opposition, flow cytometry can hardly make this distinction, as the amount of DNA is nearly identical between late G1 and early S, and between late S and G2. With this

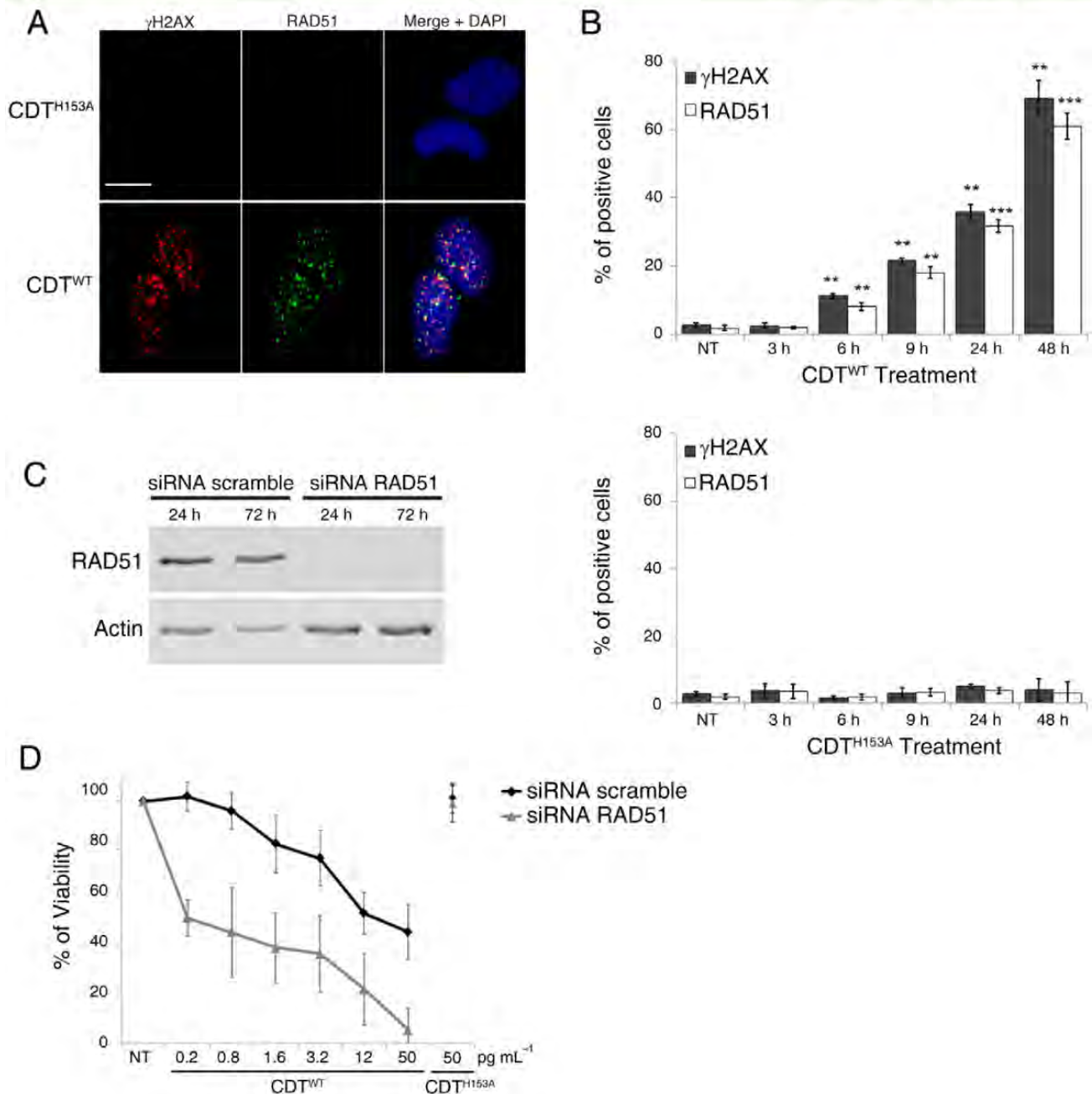


Fig. 5. Homologous recombination is crucial to repair CDT-induced DNA damage.

A. HeLa cells were exposed to CDT^{WT} or CDT^{H153A} for 24 h and stained with γH2AX (red) and RAD51 (green) antibodies. Scale bar = 20 μm.

B. Quantification of HeLa cells positive for γH2AX foci formation (dark grey bars) or RAD51 foci formation (white bars), after EcCDT^{WT} or EcCDT^{H153A} exposure for the indicated times. Cells were scored positive for foci formation when > 5 foci/nuclei were detected. *n* = 3; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

C. HeLa cells were transfected by Scramble or RAD51 siRNA. After 24 h or 72 h, RAD51 protein level was assessed by Western blot analysis with Rad51 antibody. Actin is shown as a loading control.

D. HeLa cells were transfected by Scramble (black curve) or RAD51 siRNA (grey curve) and exposed to indicated doses of EcCDT^{WT} or EcCDT^{H153A} for 72 h. 50 pg mL⁻¹ corresponds to the LD50. Cell viability was assessed by MTT test and results are expressed as the percentage of viable cells compared with the non-treated. *n* = 3; results obtained from independent experiments. Error bars, SD.

approach, we revealed a progressive accumulation of HeLa cells in early S-phase at early times of CDT treatment, leading to a lag with an accumulation of cells in late S/G2 after later treatment. Confirming these data by

synchronizing cells in G1/S and exposing them to CDT^{WT} to follow the increase of DSB during S-phase would have been interesting. However, cell synchronization assays induce DSB by their own, as reported for double thymi-

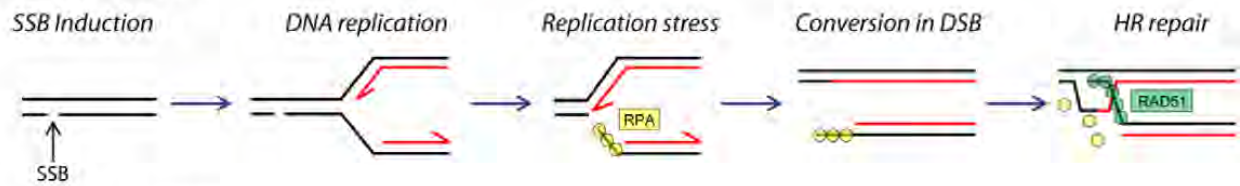
dine block, aphidicolin or hydroxyurea treatment (Kurose *et al.*, 2006). Consequently, further analyses are biased and these experiments could not be achieved. Despite this, we show in the HT1080 cell line, proficient for the G1/S checkpoint (Pellegata *et al.*, 1996), that the vast majority of cells presenting DSB are in S- or G2-phase (Fig. S1A and B), supporting the importance of replication to convert CDT-induced damage into DSB, at low doses. Because the G1/S checkpoint may be bypassed and let cells enter the S-phase (Deckbar *et al.*, 2010), and to better understand the possible role of S-phase in DSB formation, we did work on HeLa cells, devoid of G1/S checkpoint.

We observed a lag with a slight accumulation of HeLa cells in early S-phase, after a 3 h to 9 h CDT treatment (Fig. 4B and D) – such a S-phase lag having only been observed in yeast expressing *cdtB* subunit (Matangkasombut *et al.*, 2009). This accumulation of S-phase cells is associated to a transient decrease of the G2 cells content (Fig. 4D). This G2 decrease is explained both by the slowing-down of S-phase after CDT treatment, and by the fact that G2 cells exposed to CDT do not display any cell cycle alteration but rather elicits a G2 block at the following cell cycle, after a S-phase completion (Comayras *et al.*, 1997). Moreover, we demonstrate that almost all DSB arise in S-phase cells, leading the accumulation of cells positive for both 53BP1 and foci-PCNA (Fig. 4C and E). Using the cyclin B1 staining as another cell cycle marker, we then observed that DSB are detected later in the G2-phase cells, at 24 h and 48 h (Fig. 4E). However, one can argue that there are more cells in S-phase after a long EcCDT^{WT} exposure according to the PCNA staining (35% at 24 h and 57% at 48 h, Fig. 4B) than observed with the cyclin B1 staining (25% after 24 h, 18% after 48 h, Fig. 4D). The increase in G2 cells after a 24 h or 48 h long EcCDT^{WT} exposure (Fig. 4D) suggests that PCNA foci could be found in G2 cells. Such an assumption is in accordance with the role of PCNA in the post-replication repair (PRR) (see Chang and Cimprich, 2009 for review). PRR allows the replication fork passage across a lesion that will be subsequently repaired through TransLesion Synthesis (TLS) polymerases, whose recruitment depends on PCNA shown to bind chromatin after DNA damage in human cells during G2-phase (Diamant *et al.*, 2012). Besides, studies in yeast have shown that PCNA is ubiquitinated in G2 in response to DNA damage (Frampton *et al.*, 2006), this modification leading to TLS polymerases recruitment and demonstrating a replication-independent role for PCNA during DNA damage repair. Taken as a whole, our data demonstrate that CDT produces replication-associated DSB in S-phase cells (Fig. 4C and E), slowing down the replication process and leading to the accumulation of damaged cells in G2 (Fig. 4E).

We found that CDT-induced DSB are reminiscent to those induced by camptothecin, a topoisomerase-I inhibitor that traps topoisomerase-I on DNA during its cleavage intermediate step (referred as the cleavage complex). Camptothecin prevents repair of the topoisomerase-I-induced SSB (Pommier, 2006) and, during replication collision with the replication forks, converts these cleavage complexes into DSB. Hence, we analysed the kinetic of camptothecin genotoxicity and observed similar patterns of cell cycle alteration and DSB formation than those observed for EcCDT (Fig. S4). We conclude that CDT might induce irreparable SSB, leading to a replicative stress, DSB formation and cell cycle arrest. When damage like SSB stalls a replication fork, helicases of the replication complex continue to unwind DNA, revealing ssDNA rapidly coated by RPA. Interestingly, in CDT-exposed cells at low dose (LD50), RPA foci arose before 53BP1 foci at 3 h, probably reflecting a replication stress before DSB appearance (Fig. 2). Moreover, RPA and 53BP1 foci then colocalize after 6 h, strongly suggesting that this replication stress is responsible for DSB formation through the passage of the replication fork. Such S-phase-dependent DSB induction explains why cells of an asynchronous population are not simultaneously affected (Fig. 1), these DSB being responsible for the activation of the ATM-dependent checkpoint (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010).

Finally, it has been shown that HR proteins are crucial for the repair of replication-associated DSB, as for camptothecin-induced DSB (Pommier, 2006; Groth *et al.*, 2012). Interestingly, in response to CDT, S-phase associated DSB are taken in charge by HR as nearly all cells with DSB showed colocalization between γ H2AX and RAD51 foci (Fig. 5). The role of HR in replication-associated DSB induced by CDT is also supported by RPA foci disappearance at later times of treatment (Fig. 2C and D). Indeed, during HR process, RPA has to be displaced from ssDNA by recombination mediators, to allow RAD51 nucleofilament formation (reviewed in Krejci *et al.* (2012). Nevertheless, RPA-positive cells do not totally disappear, even after 48 h of LD50 EcCDT exposure (Fig. 2D). This can be explained by the low EcCDT doses used in this study, driving to a complete G2 block in all cells after 72 h (Fig. 3A). Indeed, cyclin B1 and PCNA staining show that after 24 h or 48 h of treatment, part of the cells are still in S-phase (Fig. 4B and D). These cells probably accumulate replication-associated DSB and therefore might correspond to RPA-positive cells. More importantly, we showed that HR deficiency induced by RAD51 knock-down led to a high sensitivity to CDT. Previous work in yeast also pointed out the necessity of HR proteins to survive the CDT genotoxicity (Kitagawa *et al.*, 2007; Matangkasombut *et al.*, 2009). However, cell death eventually occurs, even if HR is mobilized, suggesting the

Low doses of CDT



High doses of CDT

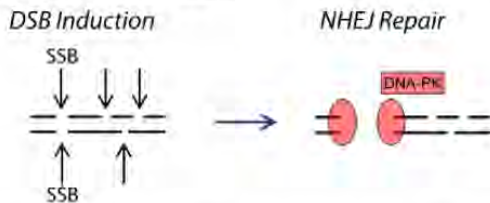


Fig. 6. Model for CDT activity. Low dose of CDT induces moderate levels of SSB. During DNA unwinding by the replication fork, SSB conversion into DSB is associated to a replication stress, leading to RPA recruitment on the exposed ssDNA. RPA is then displaced from ssDNA to allow RAD51 nucleofilament formation and repair of the DSB by HR. High dose of CDT induces important levels of SSB, potentially leading to direct DSB when two SSB are facing on each strand. These direct DSB are most probably repaired by NHEJ.

incapacity for cells to repair CDT damage. This may be important to determine if any mechanism would allow cells to repair CDT damage, and eventually lead to genomic instability, or if the absence of repair would inexorably lead to cell death. For instance, chromosomal rearrangements can lead to apoptosis in HR-defective cells or in cells repairing DSB predominantly through NHEJ (reviewed in Roos and Kaina, 2006). In this respect, it is interesting to note that high doses of CDT lead to DSB that are not taken in charge by HR, as RAD51 is not recruited (Fig. S3). Further studies are on the way to determine these phenomena. Our work is of clinical importance, as *Helicobacter hepaticus* CDT has been shown to promote cdtB-dependent hepatocarcinogenesis in a mouse model, notably through inflammation and NF-KB pathway activation (Ge *et al.*, 2007). Furthermore, many works documented the NF-KB activation in response to DNA damage, and more particularly to DSB, in an ATM-dependent way (Janssens and Tschopp, 2006), strongly suggesting that CDT may display cancerogenic activities *in vivo*. Our results underline the involvement of the cell cycle in CDT genotoxicity, lead to a better understanding of the lesions caused by CDT and the repair mechanisms that may be involved, ultimately providing a new model for the CDT mode of action (Fig. 6).

Experimental procedures

Cell culture and transfection

HeLa (ATCC CCL-2) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum, Penicillin 100 U ml⁻¹ and Streptomycin 100 µg ml⁻¹ at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For double thymidine block,

HeLa cells were plated into DMEM, and 5 mM thymidine was added for 17 h. Cells were washed twice with PBS and placed in normal thymidine-free DMEM for 12 h. Thymidine (5 mM) was added for a second 17 h period, at which time cells were washed with PBS; this point was designated t = 0 h.

For siRNA transfection, 1 × 10⁵ cells were transfected with siRNA (10 nM) using Interferin (Ozyme, France) according to the manufacturer's instructions.

Antibodies and siRNA

γH2AX mouse antibody was purchased from Merck/Millipore (JBW301), the cyclin A mouse antibody (sc-271645), the RAD51 rabbit antibody (sc-8349), the cyclin B1 antibody (sc-245) and the PCNA mouse antibody (sc-56) from Santa Cruz biotechnology, the 53BP1 rabbit antibody from Novus Biological (NB100-904), the RPA mouse antibody from Calbiochem (NA18), the Goat anti-rabbit Rhodamine Red X (R6394) and goat anti-mouse Alexa-Fluor 488 (A11017) antibodies from Molecular Probes and used as specified by the manufacturers.

All siRNA were purchased from Eurogentec. The scramble siRNA does not recognize any human mRNA. RAD51 siRNA sequence: CCAGAUUCUGUCAUACGCUA-dTdT. Scramble siRNA sequence: CAUGUCAUGUGUCACAUCU-dTdT.

Statistical analysis

Differential effects were assessed by Student's *t*-test. *P*-values below 0.05 were considered significant. To analyse the comet assays, Log values were used for Olive tail moment (Olive *et al.*, 1990).

Immunofluorescence and Western blot

For immunostaining, cells were grown on coverslip at least for 24 h before fixation with 4% paraformaldehyde, permeabilization

12 Y. Fedor et al.

with 0.5% Triton X-100 and staining with primary antibodies for 1 h, washed three times with PBS NP40 0.1% and incubated with secondary antibodies for 1 h. Cell DNA was stained with 4, 6-diamino-2-phenyl indole (DAPI). For RPA staining, a triton-extraction step is performed before fixation. RAD51 staining is described in Mirzoeva and Petrini (2001). PCNA staining is described in previous study (Kannouche and Lehmann, 2006). Slides were mounted and viewed via a Nikon 50i fluorescence microscope. For γ H2AX, 53BP1, RPA and RAD51 staining, cells were scored positive for foci formation when > 5 foci/nuclei were detected.

For Western blot analysis, soluble protein extracts from HeLa cells were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Fluorescent antibodies bound to the membrane were visualized using an Odyssey Infrared Imaging Scanner (Li-Cor ScienceTec).

Cytometry analysis

For cell cycle analysis by cytometry, HeLa cells were trypsinized, washed with PBS and fixed with 75% Ethanol at -20°C overnight. Cells were resuspended in propidium iodide solution ($250\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A, $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ Propidium iodide, 0.1% Sodium Citrate) and incubated for 1 h in the dark. Cell cycle profiles were acquired with Miltenyi MACSQuant Analyser 10 cytometer and cell cycle phases were analysed by VenturyOne software (Applied Cytometry).

Quantification of cell viability

For cellular viability assessment after siRNA transfection, a MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test was performed. Cultured cells were rinsed with phenol red-free DMEM before addition of MTT ($500\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) diluted in DMEM for 3 h. Cells were then solubilized in NaOH 0.1 M, 10% SDS, and the optical density of the cellular homogenate was measured at 570 nm and 690 nm.

Purification of CDT

Wild-type Cytolethal Distending Toxin (EcCDT^{WT}) and mutant lacking the cytotoxic activity (EcCDT^{H153A}) were produced from *E. coli* DH5 α hosting recombinant plasmid pGEM-T (Promega) encoding the three CDT-I ORFs *cdtA*, *cdtC* and wild-type or mutated *cdtB* (Scott and Kaper, 1994). Bacteria were grown aerobically for 48 h at 37°C in Trypcase Soy Broth (Biomérieux). The culture supernatants were precipitated successively with 50% and 30% ammonium sulfate, and the precipitated proteins were dissolved and dialysed against 0.025 M Tris buffer (pH 8.5). The proteins were further purified by anion exchange (DEAE Trisacryl plus-M; Sigma) followed by hydrophobic (HiTrap Phenyl Sepharose HP; Amersham) column chromatography, using an ÄKTA FPLC (Amersham) (Taieb et al., 2006). The protein quantity of the fractions has been determined by Bradford assay and their biological activity has been tested on cells: non-confluent asynchronous HeLa cells were exposed during 72 h to different concentrations of purified EcCDT and cell viability was assessed by methylene blue staining as previously described (De Rycke et al., 2000). Cell viability was expressed as the per cent ratio of

remaining viable cells over initial count, allowing the definition of lethal doses 50, 75 and 95 (LD50, LD75 and LD95).

COMET assay

Comet assay was performed as previously described (Lebailly et al., 2003) with minor modifications: tank used for horizontal electrophoresis was an Econo-Submarine (20 cm \times 30 cm) (CBS, USA). After staining with Ethidium Bromide, slides were observed at 20 \times magnification using a Nikon 50i fluorescence microscope. Images were analysed with a Luca S camera and Komet 6 software (Kinetic Imaging). Fifty cells per slide and two slides per sample were analysed. Median Olive Tail Moment (OTM) from these 100 values was calculated (Olive et al., 1990).

Acknowledgements

We are grateful to Pr Eric Oswald, Dr Jean-Philippe Nougayrède and Dr Frédéric Taieb for fruitful discussions. We would like to thank Dr Yvan Canitrot and Pr Bernard Ducommun for their support and mindful corrections. We would like to acknowledge Catherine Feliu for participating in the early steps of this work and Elisabeth Bezine for testing the effect of high CDT doses. This work was supported by the ANR programme (Grant No. ANR-10-CESA-011). Marie-Laure Nicolau-Travers was supported by the MYCA programme (Midi-Pyrénées region) and Yoann Fedor by a doctoral fellowship from French Ministry of Higher Education and Scientific Research.

References

- Alaoui-El-Azher, M., Mans, J.J., Baker, H.V., Chen, C., Progulsk-Fox, A., Lamont, R.J., and Handfield, M. (2010) Role of the ATM-checkpoint kinase 2 pathway in CDT-mediated apoptosis of gingival epithelial cells. *PLoS ONE* **5**: e11714.
- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T., and Karch, H. (2004) Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun* **73**: 552–562.
- Bravo, R., and Macdonald-Bravo, H. (1987) Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* **105**: 1549–1554.
- Chang, D.J., and Cimprich, K.A. (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol* **5**: 82–90.
- Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**: 179–204.
- Comayras, C., Tasca, C., Peres, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997) *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect Immun* **65**: 5088–5095.
- Cortes-Bratti, X. (2000) The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J Biol Chem* **276**: 5296–5302.

- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergard, T., Thelestam, M., and Frisan, T. (2001) The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J Biol Chem* **276**: 5296–5302.
- Dalal, S.N., Schweitzer, C.M., Gan, J., and DeCaprio, J.A. (1999) Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* **19**: 4465–4479.
- De Rycke, J., Sert, V., Comayras, C., and Tasca, C. (2000) Sequence of lethal events in HeLa cells exposed to the G2 blocking cytolethal distending toxin. *Eur J Cell Biol* **79**: 192–201.
- Deckbar, D., Stiff, T., Koch, B., Reis, C., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2010) The limitations of the G1-S checkpoint. *Cancer Res* **70**: 4412–4421.
- Diamant, N., Hendel, A., Vered, I., Carell, T., Reissner, T., de Wind, N., *et al.* (2012) DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity. *Nucleic Acids Res* **40**: 170–180.
- Elwell, C., Chao, K., Patel, K., and Dreyfus, L. (2001) *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. *Infect Immun* **69**: 3418–3422.
- Elwell, C.A., and Dreyfus, L.A. (2000) DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol* **37**: 952–963.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., and O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* **339**: 37–59.
- Feng, W., Di Rienzi, S.C., Raghuraman, M.K., and Brewer, B.J. (2011) Replication stress-induced chromosome breakage is correlated with replication fork progression and is preceded by single-stranded DNA formation. *G3 (Bethesda)* **1**: 327–335.
- Frampton, J., Irmisch, A., Green, C.M., Neiss, A., Trickey, M., Ulrich, H.D., *et al.* (2006) Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **17**: 2976–2985.
- Freifelder, D., and Trumbo, B. (1969) Matching of single-strand breaks to form double-strand breaks in DNA. *Biopolymers* **7**: 681–693.
- Frisa, P.S., and Jacobberger, J.W. (2009) Cell cycle-related cyclin b1 quantification. *PLoS ONE* **4**: e7064.
- Frisan, T. (2001) Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses. *Int J Med Microbiol* **291**: 495–499.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., and Thelestam, M. (2002) Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses. *Int J Med Microbiol* **291**: 495–499.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlow, B., and Thelestam, M. (2003) The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol* **5**: 695–707.
- Ge, Z., Rogers, A.B., Feng, Y., Lee, A., Xu, S., Taylor, N.S., and Fox, J.G. (2007) Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cell Microbiol* **9**: 2070–2080.
- Gelfanova, V., Hansen, E.J., and Spinola, S.M. (1999) Cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* induces apoptotic death of Jurkat T cells. *Infect Immun* **67**: 6394–6402.
- Groth, P., Orta, M.L., Elvers, I., Majumder, M.M., Lagerqvist, A., and Helleday, T. (2012) Homologous recombination repairs secondary replication induced DNA double-strand breaks after ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* **40**: 6585–6594.
- Guerra, L., Cortes-Bratti, X., Guidi, R., and Frisan, T. (2011) The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins* **3**: 172–190.
- Hassane, D.C., Lee, R.B., and Pickett, C.L. (2003) *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infect Immun* **71**: 541–545.
- Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008) Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 910–916.
- Janssens, S., and Tschopp, J. (2006) Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Differ* **13**: 773–784.
- Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S., and Duhamel, G.E. (2011) Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* **157**: 1851–1875.
- Johnson, W.M., and Lior, H. (1988) A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb Pathog* **4**: 103–113.
- Kannouche, P., and Lehmann, A. (2006) Localization of Y-family polymerases and the DNA polymerase switch in mammalian cells. *Methods Enzymol* **408**: 407–415.
- Katula, K.S., Wright, K.L., Paul, H., Surman, D.R., Nuckolls, F.J., Smith, J.W., *et al.* (1997) Cyclin-dependent kinase activation and S-phase induction of the cyclin B1 gene are linked through the CCAAT elements. *Cell Growth Differ* **8**: 811–820.
- Kitagawa, T., Hoshida, H., and Akada, R. (2007) Genome-wide analysis of cellular response to bacterial genotoxin CdtB in yeast. *Infect Immun* **75**: 1393–1402.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012) Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* **40**: 5795–5818.
- Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (2006) Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. *Cell Prolif* **39**: 231–240.
- Lara-Tejero, M., and Galan, J.E. (2000) A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* **290**: 354–357.
- Lebailly, P., Devaux, A., Pottier, D., De Meo, M., Andre, V., Baldi, I., *et al.* (2003) Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. *Occup Environ Med* **60**: 910–917.
- Li, L., Sharipo, A., Chaves-Olarte, E., Masucci, M.G., Levitsky, V., Thelestam, M., and Frisan, T. (2002) The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell Microbiol* **4**: 87–99.

- Liyanage, N.P., Manthey, K.C., Dassanayake, R.P., Kuszynski, C.A., Oakley, G.G., and Duhamel, G.E. (2010) Helicobacter hepaticus cytolethal distending toxin causes cell death in intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter* **15**: 98–107.
- Matangkasombut, O., Wattanawaraporn, R., Tsuruda, K., Ohara, M., Sugai, M., and Mongkolsuk, S. (2009) Cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces DNA damage, S/G2 cell cycle arrest, and caspase-independent death in a *Saccharomyces cerevisiae* model. *Infect Immun* **78**: 783–792.
- Mirzoeva, O.K., and Petrini, J.H.J. (2001) DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cell Biol* **21**: 281–288.
- Nesic, D., Hsu, Y., and Stebbins, C.E. (2004) Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature* **429**: 429–433.
- Nishikubo, S., Ohara, M., Ueno, Y., Ikura, M., Kurihara, H., Komatsuzawa, H., et al. (2003) An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J Biol Chem* **278**: 50671–50681.
- Olive, P.L., Banath, J.P., and Durand, R.E. (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet' assay. *Radiat Res* **122**: 86–94.
- Pan, C.Q., Ulmer, J.S., Herzka, A., and Lazarus, R.A. (1998) Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci* **7**: 628–636.
- Pascucci, B., Russo, M.T., Crescenzi, M., Bignami, M., and Dogliotti, E. (2005) The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **33**: 280–288.
- Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L., and Stanbridge, E.J. (1996) DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 15209–15214.
- Peres, S.Y., Marches, O., Daigle, F., Nougayrede, J.P., Herauld, F., Tasca, C., et al. (1997) A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol* **24**: 1095–1107.
- Pines, J., and Hunter, T. (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* **115**: 1–17.
- Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* **6**: 789–802.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**: 5858–5868.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**: 440–450.
- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., and Halazonetis, T.D. (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **151**: 1381–1390.
- Scott, D.A., and Kaper, J.B. (1994) Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* **62**: 244–251.
- Sert, V., Cans, C., Tasca, C., Bret-Bennis, L., Oswald, E., Ducommun, B., and De Rycke, J. (1999) The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers a G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks. *Oncogene* **18**: 6296–6304.
- Shenker, B.J., Demuth, D.R., and Zekavat, A. (2006) Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. *Infect Immun* **74**: 2080–2092.
- Smith, J.L., and Bayles, D.O. (2006) The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **32**: 227–248.
- Sugai, M., Kawamoto, T., Peres, S.Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., et al. (1998) The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun* **66**: 5008–5019.
- Symington, L.S., and Gautier, J. (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**: 247–271.
- Taieb, F., Nougayrède, J.-P., Watrin, C., Samba-Louaka, A., and Oswald, E. (2006) *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cell Microbiol* **8**: 1910–1921.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Cell cycle effect of CDT on p53-positive cells.

A. HT1080 cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 for 72 h. Cells were stained with propidium iodid and cell-cycle distribution analysis was performed by flow cytometry. Peaks respectively correspond to cells in G1 (left peak) or in G2 (right peak).

B. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 for 24 h and stained with 53BP1 and cyclin A antibodies. Cells positive for cyclin A (white bars), positive for 53BP1 foci formation and cyclin A (light grey bars), or positive for 53BP1 foci formation and cyclin A negative (dark grey bars) were quantified. Cells were scored positive for foci formation when > 5 foci/nuclei were detected. $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; * $P < 0.05$.

Fig. S2. Evolution of PCNA and cyclin B1 staining during cell cycle.

A. PCNA staining progresses during S-phase. Example of PCNA pan-nuclear staining (left cell), early S-phase specific, and PCNA foci staining (right cell), late S-phase specific.

B. HeLa cells were synchronized by double thymidine bloc as described in *Experimental procedures*. Cell were released in fresh medium for the indicated times and stained with an anti-PCNA antibody. Proportion of cells with a pan-nuclear staining (early S, dark grey) or foci PCNA staining (late S, lighter grey) was counted. One representative experiment is shown.

C. Cyclin B1 staining during the cell cycle. Example of various cyclin B1 staining (green): G1 cells are cyclin B1 negative; S-phase cells have a light, cytoplasmic cyclin B1 staining; G2 cells present a strong, cytoplasmic cyclin B1 staining; cells in

mitosis show a strong pan-cellular cyclin B1 staining with condensed chromosomes.

D. HeLa cells were synchronized by double thymidine bloc as described in *Experimental procedures*. Cells were released in fresh medium for the indicated times and stained with an anti-cyclin B1 antibody. Scale bar = 20 μm . According to the cyclin B1 staining, the proportion of cells in S-phase (grey), G2-phase (white) or mitosis (dark grey) has been assessed.

Fig. S3. RAD51 do not relocalize to direct DSB induced by high concentrations of CDT.

A. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} for 24 h and DSBs were detected by γH2AX (red) and RAD51 (green) immunostaining. Scale bar = 20 μm .

B. Quantification of HeLa cells positive for γH2AX and RAD51 foci formation after EcCDT^{WT} exposure for 3 h or 6 h and for the following concentrations: LD50 (50 pg ml^{-1}), LD75 (2.4 ng ml^{-1}), LD95 (25 ng ml^{-1}). Results obtained from three independent experiments. Error bars, SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. S4. Camptothecin induces replication-associated DSB similar to CDT. HeLa cells were exposed to 0.1 μM camptothecin

for the indicated times and stained with 53BP1 and PCNA antibodies.

A. HeLa cells positive for PCNA pan-staining (early S-phase cells, dark grey bars) or PCNA foci staining (late S-phase cells, light grey bars) were quantified. Cells were scored positive for PCNA foci when distinguishable foci could be observed and positive for PCNA pan-staining when PCNA stained uniformly the nucleus. $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD.

B. Quantification of HeLa cells positive for 53BP1 foci formation. Cells were scored positive for 53BP1 foci formation when > 5 foci/nuclei were detected in cells positive for PCNA foci staining (light grey bars), in cells positive for PCNA pan-nuclear staining (dark grey bars) or in cells negative for PCNA staining (white bars). $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

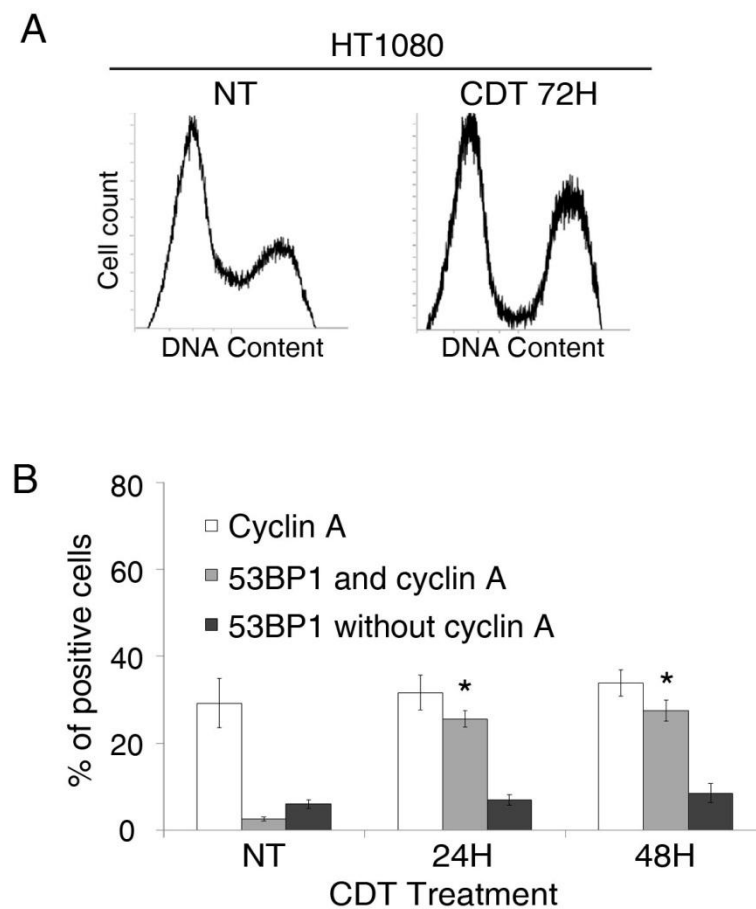
➤ *Figures supplémentaires :*

Fig. S1. Cell cycle effect of CDT on p53-positive cells. A. HT1080 cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 for 72 h. Cells were stained with propidium iodid and cell-cycle distribution analysis was performed by flow cytometry. Peaks respectively correspond to cells in G1 (left peak) or in G2 (right peak). B. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} LD50 for 24 h and stained with 53BP1 and cyclin A antibodies. Cells positive for cyclin A (white bars), positive for 53BP1 foci formation and cyclin A (light gray bars), or positive for 53BP1 foci formation and cyclin A negative (dark gray bars) were quantified. Cells were scored positive for foci formation when >5 foci/nuclei were detected. n = 3; results obtained from independent experiments. Error bars, SD; *P < 0.05.

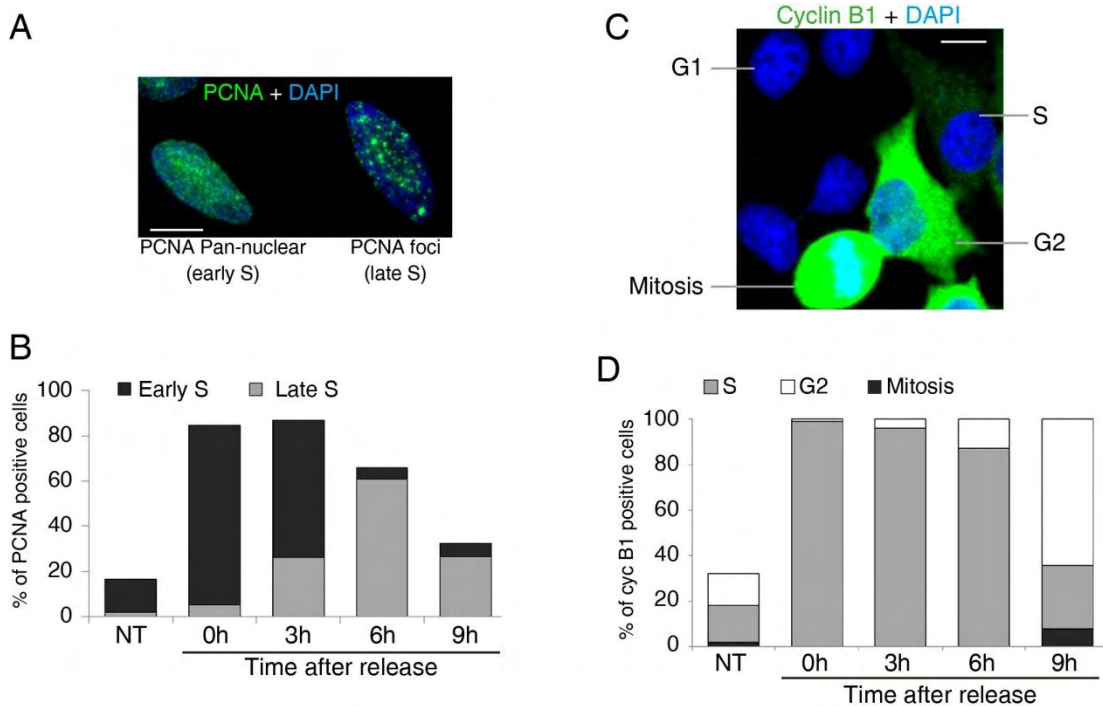


Fig. S2. Evolution of PCNA and cyclin B1 staining during cell cycle. **A.** PCNA staining progresses during S-phase. Example of PCNA pan-nuclear staining (left cell), early S-phase specific, and PCNA foci staining (right cell), late S-phase specific. **B.** HeLa cells were synchronized by double thymidine bloc as described in experimental procedures. Cells were released in fresh medium for the indicated times and stained with an anti PCNA antibody. Proportion of cells with a pan-nuclear staining (early S, dark gray) or foci PCNA staining (late S, lighter gray) was counted. One representative experiment is shown. **C.** Cyclin B1 staining during the cell cycle. Example of various cyclin B1 staining (green): G1 cells are cyclin B1 negative; S-phase cells have a light, cytoplasmic cyclin B1 staining; G2 cells present a strong, cytoplasmic cyclin B1 staining; cells in mitosis show a strong pan-cellular cyclin B1 staining with condensed chromosomes. **D.** HeLa cells were synchronized by double thymidine bloc as described in experimental procedures. Cells were released in fresh medium for the indicated times and stained with an anti-cyclin B1 antibody. Scale bar = 20 μ m. According to the cyclin B1 staining, the proportion of cells in S-phase (gray), G2-phase (white) or mitosis (dark gray) has been assessed.

A

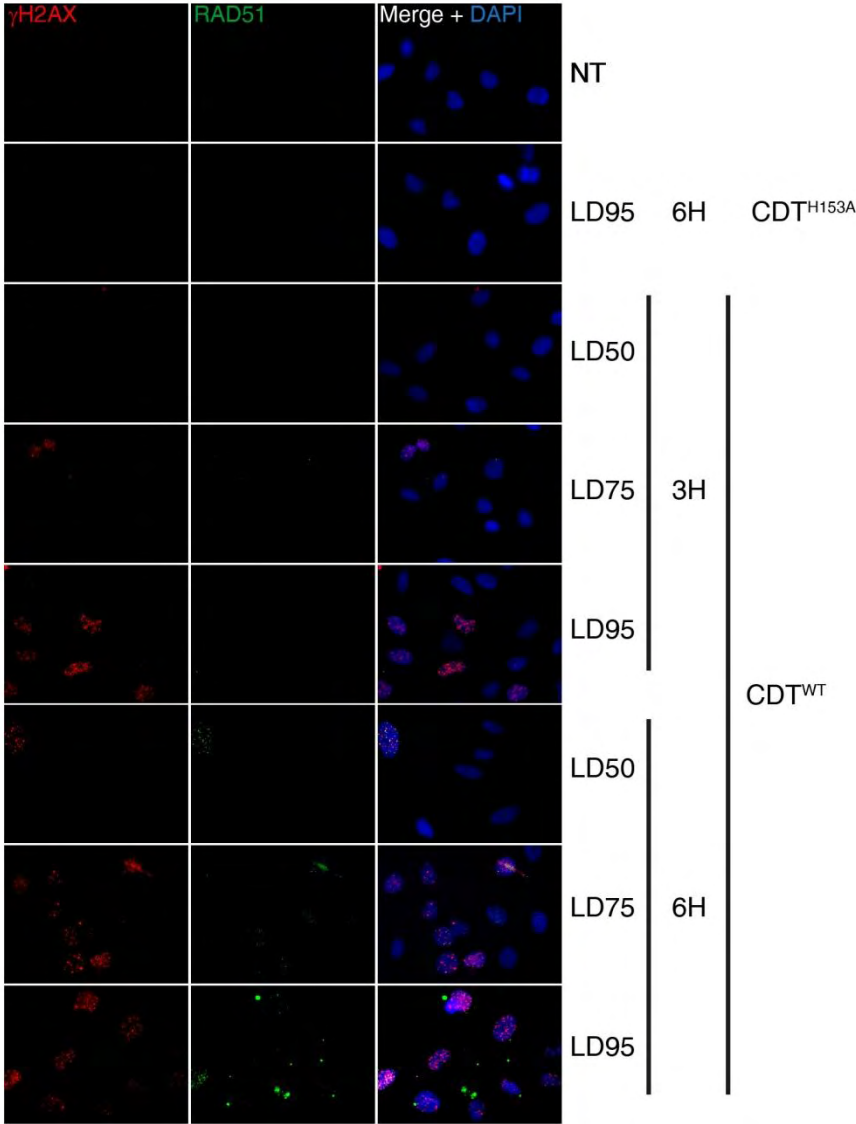


Fig. S3. RAD51 do not relocate to direct DSB induced by high concentrations of CDT. A. HeLa cells were exposed to EcCDT^{WT} for 24 h and DSBs were detected by γ H2AX (red) and RAD51 (green) immunostaining. Scale bar = 20 μ m. B. Quantification of HeLa cells positive for γ H2AX and RAD51 foci formation after EcCDT^{WT} exposure for 3 h or 6 h and for the following concentrations: LD50 (50 pg/mL), LD75 (2.4 ng/mL), LD95 (25 ng/mL). Results obtained from 3 independent experiments. Error bars, SD; *P < 0.05, **P < 0.01.

B

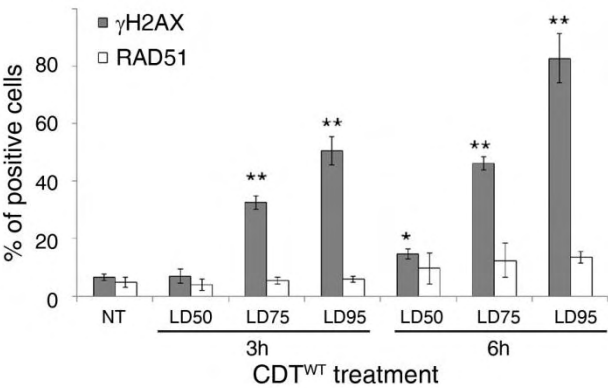


Figure S3. Fedor *et al.*, 2012

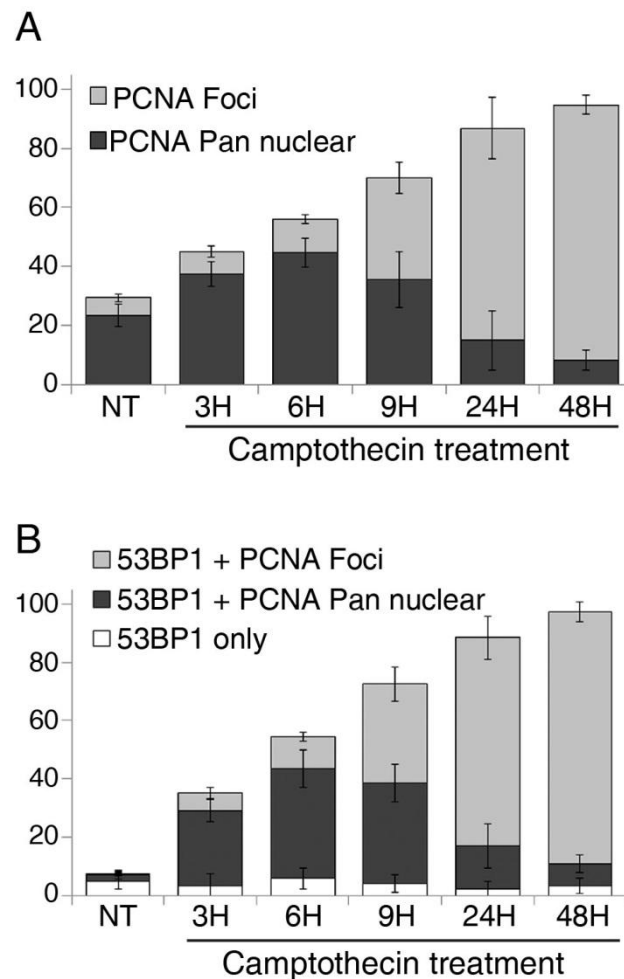
Figure S4. Fedor *et al.*, 2012

Fig. S4. Camptothecin induces replication-associated DSB similar to CDT. HeLa cells were exposed to 0.1 μ M camptothecin for the indicated times and stained with 53BP1 and PCNA antibodies. A. HeLa cells positive for PCNA pan-staining (early S-phase cells, dark gray bars) or PCNA foci staining (late S-phase cells, light gray bars) were quantified. Cells were scored positive for PCNA foci when distinguishable foci could be observed and positive for PCNA pan-staining when PCNA stained uniformly the nucleus. $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD. B. Quantification of HeLa cells positive for 53BP1 foci formation. Cells were scored positive for 53BP1 foci formation when >5 foci/nuclei were detected in cells positive for PCNA foci staining (light gray bars), in cells positive for PCNA pan-nuclear staining (dark gray bars) or in cells negative for PCNA staining (white bars). $n = 3$; results obtained from independent experiments. Error bars, SD.

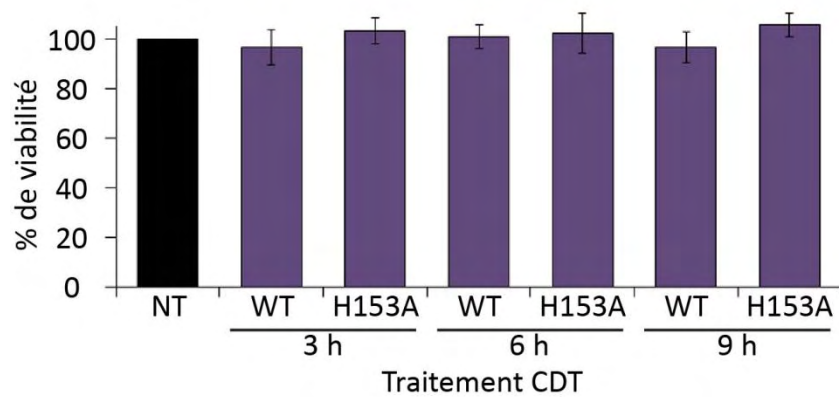


Figure 42. L'exposition à CDT à des temps précoces n'affecte pas la viabilité des cellules HeLa. Les cellules HeLa sont exposées pendant 3, 6 ou 9 h à 50 pg/mL (DL50) de EcCDT^{WT} ou EcCDT^{H153A}, leur viabilité est estimée par test MTT. La viabilité est rapportée au puits non traité (NT).

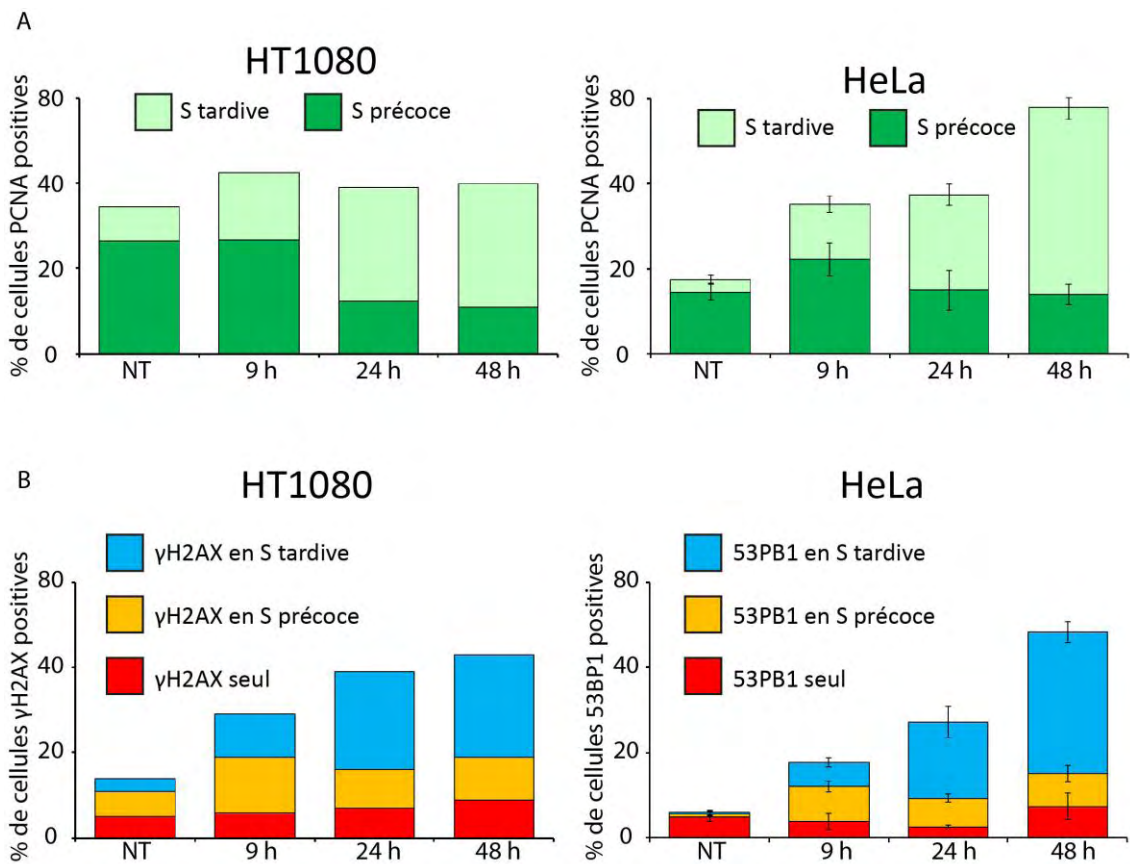


Figure 43. CDT induit une perturbation de la phase S différente entre HT1080 et HeLa. Des HT1080 ou des HeLa sont exposées pendant les temps indiqués à une LD50 de EcCDT^{WT}. Les cellules sont fixées et marquées en immunofluorescence par un anticorps anti PCNA pour analyser les cellules en phases S et anti-γH2AX ou 53BP1 pour analyser la formation de CDB. Les cellules sont classées en phase S précoce ou tardive selon le marquage décrit dans la figure S2 de l'article. Une cellule est considérée positive si elle possède plus de 5 foyers γH2AX ou 53BP1. Barres : déviation standard. N=3 pour les HeLa. HT1080 : moyenne de deux expériences indépendantes.

3) Résultats additionnels

a. Validation de l'essai COMET

Les essais COMET alcalins présentés dans la figure 2 de l'article révèlent les CSB, CDB et sites alkali-labile créés après l'exposition à EcCDT^{WT} à temps courts. Cependant, l'exposition à EcCDT^{WT} sur des temps longs provoquent la mort des cellules par apoptose (Cortes-Bratti *et al.*, 2001b). Or l'apoptose conduit à la libération de DFF40, l'endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN. Afin de déterminer si l'effet observé en COMET est dû à l'activité nucléase de cdtB ou à la fragmentation de l'ADN suite à une apoptose précoce, la viabilité des cellules HeLa est estimée en réponse à l'exposition à EcCDT^{WT} (Dose létale 50, 50 pg/mL) et EcCDT^{H153A} dans les conditions identiques à celles des COMET de l'article (Figure 42). Aucune différence significative de viabilité n'a pu être observée dans ces conditions, signifiant que le signal obtenu en COMET n'est pas dû à une apoptose précoce, mais bien à l'activité génotoxique de EcCDT^{WT}.

b. L'effet de CDT sur une lignée fonctionnelle pour p53

Comme évoqué dans l'article, le statut p53 semble être un élément important dans la réponse à EcCDT^{WT}. En effet, ces cellules HT1080 possèdent un checkpoint G1/S grâce à une protéine p53 fonctionnelle (Pellegata *et al.*, 1996) et réagissent différemment des HeLa à l'exposition à EcCDT^{WT}. Alors que les cellules HeLa en phase S et G2 continuent de s'accumuler entre 24h et 48h d'exposition à EcCDT^{WT}, les HT1080 semblent atteindre un plateau après 24h (Figure S1 B de l'article). Cela supposerait que les cellules qui s'accumulent soient celles qui étaient en phase S au moment de l'exposition, et qui se sont arrêtées au checkpoint G2 suivant. Afin d'analyser plus finement la réponse des HT1080 à EcCDT^{WT}, l'évolution de la phase S et l'apparition de CDB sont analysées chez les HT1080 en réponse à EcCDT^{WT} et comparées aux HeLa (Figure 43).

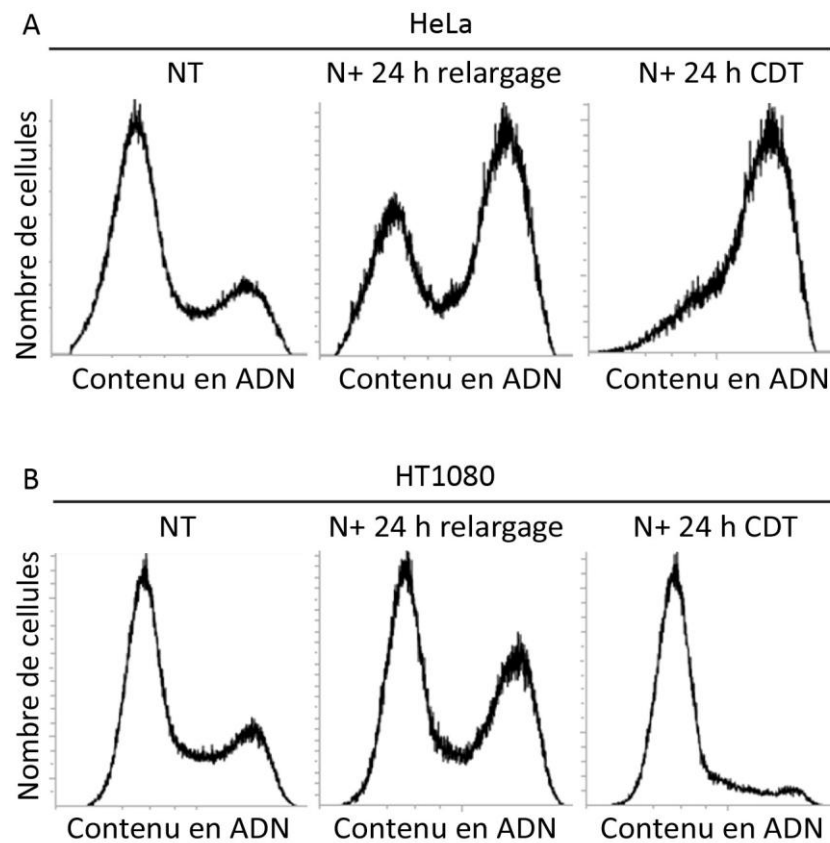


Figure 44. Influence du checkpoint G1/S dans la réponse à CDT.

Des cellules HeLa (A) ou HT1080 (B) ont été synchronisées en mitose par double bloc thymidine/nocodazole (voir procédures expérimentales). 2 h après le relargage dans du milieu frais, les cellules sont exposées ou non à une DL50 de EcCDT^{WT}. 24 heures plus tard, le profil du cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux. NT : cellules non synchronisées et non traitées à EcCDT^{WT}. N+24h relargage : Cellules synchronisées en mitose puis relarguées 24 h sans traitement. N+ 24 h CDT : cellules synchronisées en mitose puis relarguées 24 h avec 1LD50 de EcCDT^{WT}. Le premier pic correspond aux cellules en phase G1, le second aux cellules en G2/M. Une expérience représentative est montrée.

De manière intéressante, le nombre total de HT1080 marquées par PCNA ne semble pas augmenter au cours des 48 h de traitement EcCDT^{WT}, contrairement aux HeLa (Figure 43 A), ce qui corrèle avec les résultats obtenus avec la cycline A (Figure S2 de l'article). En revanche la proportion de HT1080 marquées en fin de phase S augmente après 24 h d'exposition, parallèlement à la diminution des HT1080 en phase S précoce. Comme supposé pour les HeLa dans l'article, le marquage PCNA en foyers caractéristique de la fin de phase S pourrait représenter de la réparation post-répllicative chez les HT1080 en réponse à EcCDT^{WT}. Ceci est probable étant donné l'accumulation de CDB dans les HT1080 avec un marquage PCNA en foyer (Figure 43 B). Ces données montrent que, comme pour les HeLa, l'apparition de CDB en réponse à CDT se fait majoritairement par la phase S chez les HT1080. De plus, cette exposition provoque une augmentation de la proportion de HT1080 avec des foyers PCNA et endommagées, comme pour les HeLa. En revanche, une différence importante distingue les deux lignées : si la proportion de cellules en phase S augmente tout au long de l'exposition des HeLa, le checkpoint G1/S fonctionnel des HT1080 empêche probablement l'entrée de nouvelles cellules dans la phase S.

Afin d'établir l'efficacité du checkpoint G1/S des HT1080 en réponse à CDT, les deux lignées sont testées pour leur capacité à franchir ce checkpoint en réponse à une exposition à CDT.

De manière intéressante, on observe une réponse différente entre les deux lignées. Confirmant l'absence d'un checkpoint G1/S fonctionnel chez les HeLa, l'exposition à CDT provoque l'arrêt à la G2 suivante uniquement (Figure 44 A, 3^{ème} graphique), alors que les HeLa relarguées sans traitement EcCDT^{WT} poursuivent leur cycle cellulaire (Figure 44 A, 2nd graphique). En revanche, les HT1080 traitées EcCDT^{WT} sont stoppées au checkpoint G1/S (Figure 44 B, 3^{ème} graphique), alors que les HT1080 relarguées sans EcCDT^{WT} ont franchi le checkpoint G1/S et poursuivent leur cycle (Figure 44 A, 2^{ème} graphique). Ces données prouvent qu'en réponse aux dommages produits par CDT, les HT1080 sont capables d'activer le checkpoint G1/S et de stopper le cycle cellulaire, tandis que les HeLa ne peuvent être stoppées qu'en G2/M.

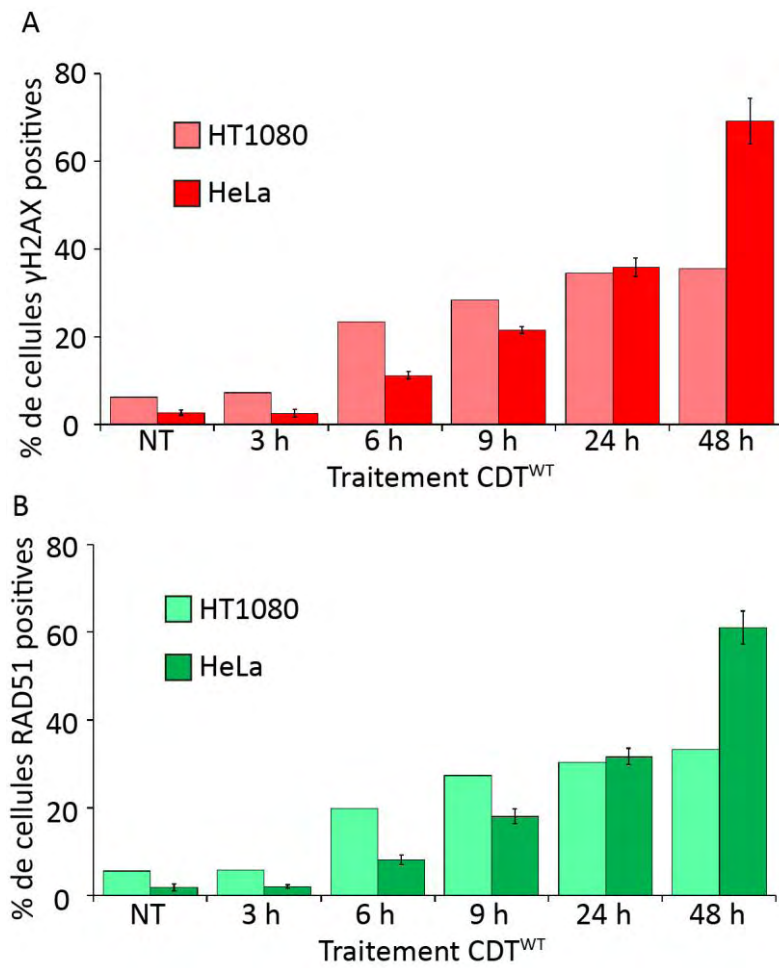


Figure 45. Recrutement de RAD51 dans les HT1080 en réponse à CDT.

Les cellules HT1080 ou HeLa sont exposées à 1 DL50 de EcCDT^{WT} pendant les durées indiquées. Les cellules sont fixées marquées en immunofluorescence par des anticorps anti RAD51 et γ H2AX. Une cellule est considérée comme positive si elle possède plus de 5 foyers (RAD51 ou γ H2AX). Barre d'erreur : déviation standard. N=3 pour les HeLa.

Les CDB dépendantes de EcCDT^{WT} à faible dose se produisent en phase S, aussi bien dans les HeLa que les HT1080 (Figure 43). Si ces CDB associées à la réplication semblent être prises en charge par RH dans les HeLa, ce devrait être également le cas dans les HT1080 exposées à CDT. Pour cela, les HeLa et les HT1080 sont exposées à EcCDT^{WT} LD50, puis le recrutement de RAD51 et la phosphorylation de γ H2AX sont analysés.

De manière intéressante, même si aucune CDB n'est détectée après 3 h d'exposition chez les HT1080, la quantité de HT1080 positives pour γ H2AX semble être plus importante que les HeLa à 6 h d'exposition (Figure 45 A). Etant donné que l'apparition des CDB est liée au cycle cellulaire, ceci s'explique par le temps de doublement des HT1080 (environ 19 h) inférieur à celui des HeLa (environ 27 h). Les HT1080 cyclant plus rapidement, on peut supposer qu'elles accumulent les CDB associées à la réplication plus rapidement que les HeLa. Comme observé précédemment, le nombre de HT1080 avec des CDB atteint un plateau après 24 h de traitement, alors que les cellules HeLa positives pour γ H2AX continuent de s'accumuler. Comme pour les HeLa, chaque foyer RAD51 colocalise avec une CDB chez les HT1080. Par conséquent, l'évolution du nombre de HT1080 positives pour RAD51 suit donc l'augmentation du marquage γ H2AX en réponse à EcCDT^{WT} (Figure 45 B), et on observe le même plateau après 24 h. Ces résultats démontrent que les CDB associées à la réplication, causées par EcCDT^{WT}, sont prises en charge par la RH aussi bien dans les HT1080 que dans les HeLa.

c. Un marqueur de stress réplcatif : les 53BP1 *nuclear bodies*

Notre article a montré que les cellules exposées à CDT subissaient un stress réplcatif, responsable de la formation de CDB. Or deux études ont montré que des structures bien particulières se formaient en réponse aux stress réplcatifs : les 53BP1 *nuclear bodies* (Harrigan *et al.*, 2011, Lukas *et al.*, 2011). Il s'agit de foyers 53BP1, environ 5 fois plus grand que les foyers classiques (Figure 45 A), dont la formation est dépendante de γ H2AX et ATM. Ils sont essentiellement présents dans les cellules en G1 (cycline A négative, Figure 45 B) et disparaissent au cours de la phase S. S'ils sont

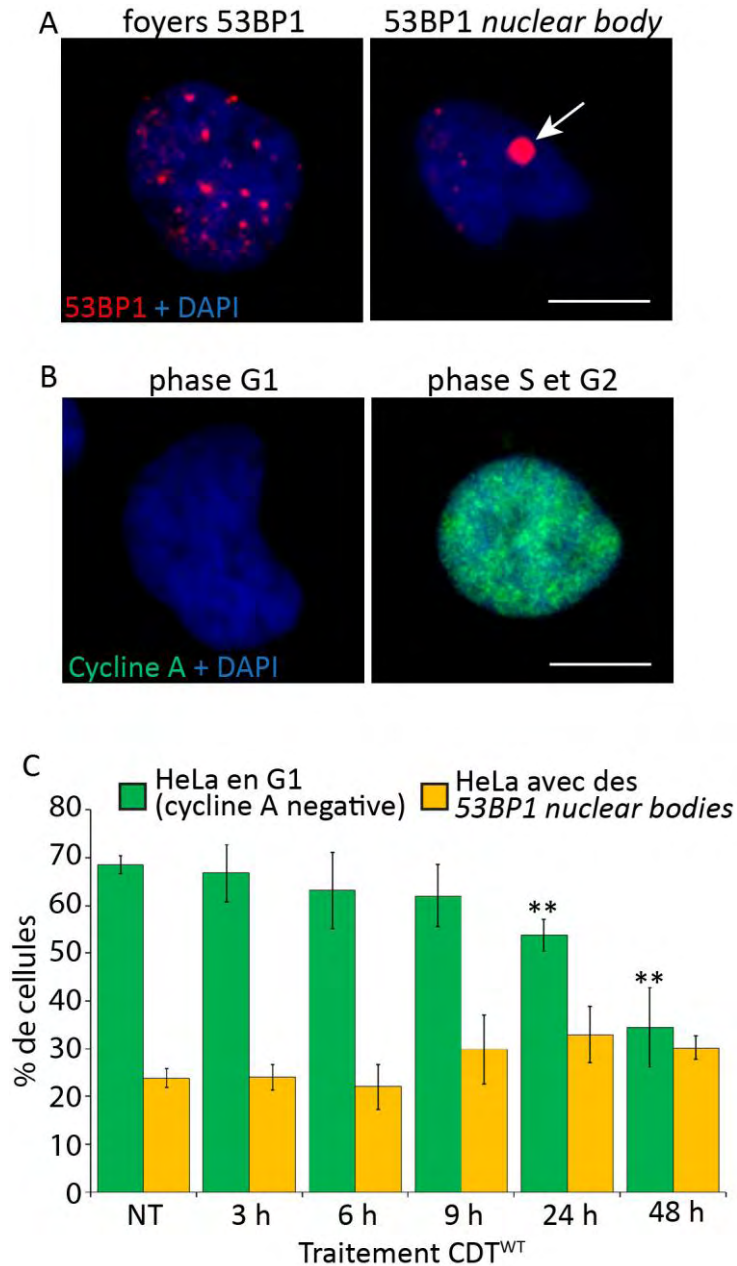


Figure 46. Formation de 53BP1 nuclear bodies en réponse à CDT.

A. Les différents marquages 53BP1 (Rouge) en HeLa. Distinction entre les foyers 53BP1 marquant les CDB (gauche) et les 53BP1 nuclear bodies (droite, flèche blanche). B. Principe du marquage cycline A pour identifier les cellules en G1. Exemple de HeLa en phase G1 (cycline A négative, gauche) et en phase S ou G2 (cycline A positive, droite). C. Les cellules HeLa sont exposées pendant les durées indiquées à une DL50 de EcCDT^{WT} puis marquées par immunofluorescence avec des anticorps anti-cycline A et 53BP1. Les cellules en G1 sont identifiées (comme expliqué en B.) et comptées (colonnes vertes). Les HeLa possédant au moins un 53BP1 nuclear body sont comptées (colonnes jaunes). Barres d'erreurs : déviation standard. N = 3 expériences indépendantes. **P < 0.01.

produits spontanément dans les cellules prolifératives, ils sont préférentiellement associés aux sites fragiles difficiles à répliquer et leur incidence augmente après un stress réplicatif, même léger (comme un traitement à faible concentration d'aphidicoline). Le rôle des 53BP1 *nuclear bodies* est mal connu, les modèles proposent une fonction protectrice des séquences mal répliquées ou des lésions chromatinienne (Lukas *et al.*, 2011) afin d'éviter leur dégradation. Pour confirmer le stress réplicatif par CDT, nous avons recherché la présence de 53BP1 *nuclear bodies* dans des cellules HeLa exposées à EcCDT^{WT}. Afin d'identifier les cellules en G1, un marquage cycline A a été effectué pour éliminer toutes les cellules en S ou G2 (Figure 46 B). Comme expliqué dans l'article, l'exposition à EcCDT^{WT} conduit à l'accumulation de cellules HeLa en G2 et par conséquent, la diminution du nombre de cellules en G1, cycline A négatives (Figure 46 C). En revanche, le nombre total de cellules portant un ou plusieurs 53BP1 *nuclear bodies* ne semble pas augmenter de manière significative au cours de l'exposition à EcCDT^{WT} (Figure 46 C). Cependant, le nombre de cellule en G1 diminuant, la proportion de 53BP1 *nuclear body* dans les cellules en G1 restantes augmente au cours de l'exposition. Après 48 h d'exposition, la quasi-totalité des cellules en G1 (88%) restantes porte au moins un 53BP1 *nuclear body*. Ces données confirment la réalité du stress réplicatif induit par EcCDT^{WT}.

4) Procédures expérimentales additionnelles

Synchronisation en mitose : bloc thymidine-nocodazole

Des cellules à 40% de confluence sont incubées avec 2 mM de thymidine pendant 24h. La thymidine est éliminée et remplacée par du milieu frais, pendant 3h. 50 ng/mL de nocodazole sont ajoutés au milieu pendant 12 h. Les cellules sont lavées deux fois au PBS.

5) Discussion / Perspectives

a. Préciser l'activité DNase de cdtB

La littérature considérait CDT comme une enzyme capable d'induire des CDB directes conduisant à l'activation du checkpoint G2/M de manière dépendante d'ATM (Cortes-Bratti, 2000, Alaoui-El-Azher *et al.*, 2010). Les enzymes de restriction de type 2 sont des endonucléases capables de créer des CDB sites-spécifiques. Chaque enzyme possédant un site endonucléase, l'association en homodimères est indispensable pour cliver les deux brins d'ADN (Pingoud *et al.*, 2001). Afin de déterminer si, à hautes doses, toutes les CDB provoquées par CDT sont issues de CSB se faisant face, ou si cdtB est capable d'induire directement des CDB, il serait intéressant de vérifier si cdtB est capable de s'homodimériser. A l'heure actuelle, les seuls domaines d'interaction protéine-protéine connus de cdtB sont ceux lui permettant d'interagir avec les autres sous-unités, cdtA et cdtC. Isoler d'hypothétiques formes multimériques de cdtB serait possible par gel filtration de cdtB purifié. D'autre part, en fusionnant indépendamment cdtB avec deux tags différents, il serait possible de confirmer cette multimérisation par immunoprécipitation d'une forme taguée avec la seconde. Si l'interaction est confirmée, il sera alors crucial de localiser le domaine impliqué et déterminer si l'inactivation de ce domaine peut influencer sur la capacité de cdtB à couper l'ADN double-brin. Cependant, l'hypothèse de multimères de cdtB reste peu probable : en effet, les expériences de digestion de plasmides circulaires par cdtB *in vitro* montrent d'abord la formation d'ADN relaxé (produit par des CSB) avant la formation d'ADN linéaire (produit par des CSB) (Elwell *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2002, Elwell *et al.*, 2001, Mao *et al.*, 2002). Malgré les temps d'incubation (jusqu'à 12h) et les concentrations de cdtB élevées (de 1 µg à 20 µg de cdtB purifié par réaction), cet ADN linéaire persiste et n'est pas dégradé en smear, ce qui signifie qu'une seule CDB au maximum s'est produite sur ces plasmides. Ce résultat serait cohérent avec l'action d'une DNase monomérique, provoquant des CSB et conduisant à des CDB uniquement lorsque deux CSB sont proches, plutôt qu'avec l'action d'enzymes de restrictions classiques conduisant au clivage direct des deux brins et à la formation

d'ADN linéaire. Néanmoins, on ne peut pas exclure que les cofacteurs nécessaires à l'activité DNase double-brin optimale de CDTb soient absents des essais *in vitro*.

b. Etudier les voies de réponses aux dommages activées par CDT

Notre travail démontre que CDT produit des CDB au cours de la phase S, *via* un stress réplcatif. Lors d'un ralentissement/blocage de fourche, une voie de signalisation impliquant RPA, ATR, ATRIP et CHK1 est nécessaire pour stabiliser au maximum la fourche de réplication (la voie est développée dans le chapitre I. 2) d.). Les modèles actuels prédisent que si la fourche ne redémarre pas, elle peut s'effondrer et provoquer une CDB, signalée alors par la voie ATM-CHK2 (chapitre I. 3) b.). Des résultats préliminaires au laboratoire semblent corroborer cette hypothèse : ils montrent une phosphorylation de CHK1 (voie ATR) antérieure de plusieurs heures à l'activation d'ATM (Elisabeth Bezine, données non publiées). γ H2AX étant un substrat d'ATR et ATM, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité d'ATR (Peasland *et al.*, 2011) ou d'ATM (Hickson, 2004), ou encore la déplétion de ces deux protéines par ARN interférence, renseignerait plus efficacement sur leur implication lors de l'apparition des foyers γ H2AX associés à CDT.

c. La réparation des dommages causés par CDT

➤ *La réparation post réplcative*

Lorsqu'un dommage perturbe la progression de la fourche de réplication, des voies telles que le *template switching* ou la TLS (chapitre I. 2) e.) sont chargées d'assurer le redémarrage de la fourche et de répliquer l'ADN endommagé. Selon le modèle actuel, ces deux voies opéreraient aussi bien au niveau de la fourche qu'après passage de celle-ci : c'est la réparation post-réplcative (*Post replication repair*, PRR). Des modifications post-traductionnelles (mono ou polyubiquitylation) de PCNA sont essentielles dans ce processus. Or, après une longue exposition à la toxine CDT (plus de 24 ou 48 h), nous observons des foyers PCNA en phase G2, qui pourraient correspondre à de la PRR. Il est

possible d'analyser l'état d'ubiquitination de PCNA par western blot, car les groupements ubiquitines (environ 8 kDa chacun) ajoutés en chaîne provoquent une augmentation de la taille de PCNA (un *shift*), visible en western blot (Karras *et al.*, 2010). Tester l'importance des modifications de PCNA en réponse à CDT pourrait être possible en complétant des cellules PCNA déficientes avec une forme mutée sur la lysine 164 mono-ubiquitinée. Si cette ubiquitination est importante pour la survie à CDT, on devrait s'attendre à une sensibilisation des cellules.

➤ *La réparation par NHEJ à fortes doses*

La RH est cruciale pour la prise en charge de dommages réplicatifs (voir chapitre I. 4) b.) tels que les CDB provoquées par les effondrements de fourches. L'implication de la RH au cours de la phase S se fait à plusieurs niveaux, puisque des protéines clefs de la RH (telle RAD51) sont nécessaires pour le *template switching*, ou encore la réparation des pontages inter-brins au cours de la réplication par la voie de l'anémie de Fanconi. Il est donc cohérent de constater que la RH, par l'intermédiaire de RAD51, prend en charge les CDB induites par CDT à faibles doses. Pour de fortes doses de CDT, produisant des CDB indépendantes de la réplication, nous supposons un rôle plus important de la NHEJ. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en analysant le recrutement sur la chromatine des protéines de la NHEJ (Ku, DNA-PK, Ligase IV, XRCC4...) par fractionnement cellulaire. De plus, l'inhibition de la NHEJ, par siRNA ou inhibiteurs spécifiques, pourrait avoir des impacts différents sur la viabilité cellulaire en fonction des doses de CDT utilisées.

➤ *Le rôle de la recombinaison homologue*

Si l'inhibition de la RH conduit à une hypersensibilité des cellules aux CDB de CDT, la prise en charge par la RH lors de la phase S ne semble pas empêcher la mort de la cellule ou l'activation de la senescence. Cela peut supposer que, bien que la RH soit mobilisée, elle est incapable de réparer les CDB induites par CDT. C'est envisageable si on imagine que cdtB reste fixée aux extrémités ADN après cassure, empêchant la prise en charge

efficace par la RH, ou si cdtB a un effet inhibiteur sur les protéines de réparation. Une observation comparable a pu être effectuée sur des cellules humaines (HCT116) exposées sur de longues durées à CDT (60 jours) : si les cellules survivantes présentent effectivement des défauts dans la réponse aux dommages à l'ADN, il est impossible de dire si ceux-ci sont dus à une régulation négative des voies ou à des mutations (Guidi *et al.*, 2012). Afin de vérifier si, à court terme, CDT influe sur la réparation, il serait intéressant de vérifier l'efficacité de la RH en réponse à CDT, grâce à des tests fonctionnels de réparation : par exemple à l'aide du système DR-GFP, où la reconstitution d'une GFP fonctionnelle dépend de l'utilisation de séquences homologues pour réparer des cassures induites par une enzyme de restriction (pour revue, voir Willers *et al.*, 2002).

L'utilisation de la lignée HT1080 fonctionnelle pour p53 nous a permis de mettre en évidence l'importance du checkpoint G1/S et d'accentuer le rôle de la phase S dans la formation des CDB produites par CDT. Dans la plupart des modèles, p53 est nécessaire à l'activation du checkpoint G1/S en réponse aux dommages et participe à l'activation du checkpoint G2/M. En réponse à des dommages à l'ADN, les lignées tumorales déficientes pour p53 passent en phase S (Fan *et al.*, 1997, pour revue Hartwell *et al.*, 1994) mais s'arrêtent au checkpoint G2 (Kastan *et al.*, 1991, Bae *et al.*, 1995). Ceci signifie que p53 n'est pas obligatoire à l'activation du checkpoint G2, et que l'inhibition de CDC25 par ATM-CHK2 et/ou ATR-CHK1 est suffisante pour activer le checkpoint G2, en l'absence de p53. Néanmoins, le statut p53 n'est pas le seul élément variant entre les HT1080 et les HeLa. Les deux lignées provenant de tumeurs, et donc de tissus différents, d'autres paramètres (comme le trafic intracellulaire, les protéines de membrane, le métabolisme...) pourraient expliquer les différences de réponse à CDT observées entre les deux lignées. C'est pourquoi il serait intéressant de confirmer l'importance de p53 dans deux lignées isogéniques, dont l'une est déficiente pour p53 (Bunz *et al.*, 1999).

d. L'effet de CDT sur les cellules en prolifération in vivo

➤ CDT dans l'intestin

Grâce à notre approche *in cellulo*, nous avons pu mettre en évidence que l'action à faible dose de CDT provoque des CDB en priorité dans les cellules en phase S, donc prolifératives. Il serait intéressant de vérifier la réalité de cette affirmation dans un contexte *in vivo*. CDT est exprimé par plusieurs souches de bactéries commensales, comme *E. coli* (pour revue, Jinadasa *et al.*, 2011), et l'intestin est un tissu en constant renouvellement. Les cellules prolifératives sont concentrées en majorité dans les cryptes de Lieberkühn, des invaginations de l'intestin, et migrent en direction de la lumière intestinale, vers les villosités, lors de leur différenciation (pour revue, Crosnier *et al.*, 2006). D'une manière similaire à notre étude sur lignée établie, il serait intéressant d'observer si l'effet de CDT est plus important sur ces cellules en prolifération plutôt que sur les cellules voisines, et si CDT est capable d'affecter le renouvellement tissulaire. Le renouvellement tissulaire intense fait de l'intestin un terrain relativement hostile pour les bactéries cherchant à le coloniser. CDT pourrait ainsi procurer un avantage sélectif en réduisant ce renouvellement et en favorisant la colonisation de la bactérie qui le produit. Cette hypothèse est notamment alimentée par des travaux chez un modèle murin d'entérite, où la colonisation de *Campylobacter jejuni* est spécifiquement favorisée par l'expression de CDT (Fox *et al.*, 2004).

L'impact d'une telle génotoxine *in vivo* soulève également la question du risque carcinogène. Un travail récent vient de démontrer que CDT est capable de provoquer une instabilité chromosomique à l'origine de mutations, lors d'une exposition chronique dans une lignée humaine (Guidi *et al.*, 2012). Chez la souris, deux études ont démontré que l'expression de CDT -par des souches *Campylobacter jejuni* ou *Helicobacter hepaticus*- était à l'origine de lésions dysplasiques potentiellement cancéreuses, respectivement dans l'estomac (Fox *et al.*, 2004) et dans le foie (Ge *et al.*, 2007).

➤ CDT dans l'estomac

Helicobacter pylori, est une bactérie très répandue dans le microbiote gastrique et est fréquemment à l'origine d'infections bactériennes. De plus, lors de ces infections, *H.*

pylori provoque une réponse inflammatoire favorisant l'apparition de cancers de l'estomac, si bien que *H. pylori* est officiellement considérée comme cancérigène par l'IARC (*International Agency For Research On Cancer*). Dans le monde, l'adénocarcinome gastrique est la deuxième cause de mort par cancer, les patients ayant moins de 15% de chances survie au-delà de 5 ans. Seule une petite proportion des individus colonisés par cette bactérie développe un adénocarcinome, mais tous sont sujets à une gastrite chronique persistante (Peek *et al.*, 2002).

Certaines protéines de *H. pylori* semblent importantes pour sa cancérogénicité, même si le lien de cause à effet reste flou, à commencer par la protéine VacA (Sundrud, 2004), qui induit la formation de vacuoles dans les cellules épithéliales. Mais également, les protéines BabA, SabA, OipA (adhésines permettant à *H. pylori* de s'accrocher aux cellules cibles) sont essentielles aux cancers induits par *H. pylori* (Franco *et al.*, 2008). Enfin, des protéines de l'îlot de pathogénicité nécessaires au système d'injection de type IV sont impliquées : par exemple, virB11, cagA et cagE (*Cytotoxicity associated antigen A, E*) (Lima *et al.*, 2010). On soupçonne virB11, cagA et cagE de favoriser la cancérogénèse gastrique, en stimulant la prolifération et la survie en interagissant avec la voie des *Mitogen-activated protein kinase* (MAP-kinase) (pour revue, Lax *et al.*, 2002). Par ailleurs, les cancers gastriques induits par *H. pylori* présentent une instabilité génétique et des systèmes de réparation moins efficaces (Machado *et al.*, 2010). Etant donné que ces caractéristiques rappellent la génotoxicité de CDT, il serait intéressant d'analyser l'expression de potentielles génotoxines dans ces souches de *H. pylori*. Pour l'instant, aucun gène codant pour CDT chez *H. pylori* n'a pu être identifié (Tomb *et al.*, 1997, Suerbaum *et al.*, 2003), mais on ne peut exclure l'implication d'autres génotoxines, comme la colibactine. Ceci mènerait à une théorie intéressante : si les protéines d'adhésion et du système de transport de type IV sont effectivement importantes pour la cancérogénèse gastrique, serait-ce parce qu'elles permettent d'injecter une génotoxine directement dans la cellule cible ?

➤ CDT dans le foie

CDT est exprimé par *Helicobacter hepaticus*, un pathogène du foie responsable

d'hépatites chez la souris et qui est génétiquement proche d'*Helicobacter pylori*. Ce pathogène est capable d'induire en 4-10 mois des lésions néoplasiques potentiellement cancérigènes dans le foie de souris infectées, et ce, de manière dépendant de cdtB (Ge *et al.*, 2007). L'implication d'*Helicobacter hepaticus* dans les hépatites humaine est encore vague, mais il semble important pour la santé de vérifier si les souches bactériennes colonisant le foie expriment CDT. En effet, le foie possède la capacité de se régénérer en cas de lésions, en stimulant la division des hépatocytes. Si CDT provoque effectivement des CDB dans les cellules en prolifération *in vivo*, cette régénération pourrait bien être le point d'origine d'un cancer. Ce point semble particulièrement important dans les cas de greffes partielles du foie : en effet, après hépatectomie partielle, la partie du foie restant chez le donneur se régénère par divisions cellulaires. La partie du foie transplantée subit également une prolifération accrue chez le greffé, afin de remodeler l'organe. Si le foie est contaminé par une souche produisant CDT, on peut imaginer que la génotoxicité induite par CDT puisse conduire à un cancer, facilité par l'immunosuppression du greffé.

IV. Conclusion générale

D'une part, mon travail de thèse sur les nanobodies a permis de participer au développement d'un nouvel outil, qui permettrait de suivre les CDB en temps réel, dans une cellule vivante. Cet outil nécessite encore de la mise au point et des étapes de validation *in vivo* et *in vitro* pour confirmer que γ H2AX est bien la cible du nanobody, même si les résultats préliminaires sont prometteurs. Si la preuve de concept est établie, cet intrabody constituerait à ma connaissance l'un des premiers nanobodies intracellulaires capable de traquer une modification post-traductionnelle en temps réel. Cet outil constituerait donc une avancée significative dans la maîtrise et la manipulation de la technologie des nanobodies.

L'utilisation d'un tel outil en recherche fondamentale fournirait des renseignements intéressants et précis sur les cinétiques d'apparition et de réparation des CDB, en fonction du statut des protéines de réparation/signalisation, mutées dans certains syndromes. Utilisé en recherche appliquée, cet outil pourrait renseigner sur l'évaluation du risque d'agents génotoxiques, seuls, en combinaison ou métabolisés. Il est d'une importance cruciale de pouvoir discriminer les agents produisant des CDB réparables de ceux produisant des CDB persistantes irréparables.

Enfin, cet outil peut lui-même évoluer pour s'adapter à d'autres besoins. En effet, les nanobodies sont en général intrinsèquement stables et utilisables dans de nombreux contextes (animaux, systèmes cellulaires, biochimie...). De plus, ils sont aisés à produire et à exprimer en fusion avec d'autres protéines. Enfin, ils diffusent largement dans les tissus vivants, sont bien tolérés par le système immunitaire et sont rapidement éliminés. Grâce à ces caractéristiques, les nanobodies pourraient potentiellement supplanter les anticorps double-chaîne classiques dans bien des domaines. Par conséquent, le développement de nouveaux nanobodies et la maîtrise de cette technologie pourrait à terme, représenter une petite révolution dans le monde de la biologie et de ses biomarqueurs.

D'autre part, mon travail de recherche sur le mécanisme génotoxique de CDT a permis d'éclaircir certaines incompréhensions liées à son modèle actuel, en démontrant l'importance du cycle cellulaire dans la génotoxicité de CDT. Il ouvre

également des perspectives de recherche intéressantes pour appréhender la signalisation et la réparation des dommages induits par CDT. Le fonctionnement intracellulaire de CDT recèle encore plusieurs zones d'ombres, comme ses cibles à la membrane cellulaire, la manière dont il détourne les protéines du trafic, ainsi que ses interactions avec l'ADN génomique. Les avancées scientifiques permettent de détecter de plus en plus de souches bactériennes, pathogènes ou commensales, exprimant cette génotoxine. Il semble donc capital de bien comprendre les risques sanitaires qu'elle présente.

L'implication d'*Helicobacter pylori* dans les ulcères et les cancers de l'estomac a éclairé sous un jour nouveau le rôle des interactions hôtes-pathogènes dans l'apparition de certaines pathologies, dont le cancer. Les processus mis en œuvre par les bactéries pathogènes ou commensales pour nous coloniser affectent notre organisme par bien des aspects. Identifier et décrypter ces interactions fourniraient alors de nouvelles pistes pour prévenir ces pathologies.

V. Références

- Admire, A., Shanks, L., Danzl, N., Wang, M., Weier, U., Stevens, W., *et al.* (2006). Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast. *Genes Dev* **20**, 159-173.
- Aguilera, A. and Gomez-Gonzalez, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**, 204-217.
- Ahnesorg, P., Smith, P. and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-313.
- Alaoui-El-Azher, M., Mans, J.J., Baker, H.V., Chen, C., Progulske-Fox, A., Lamont, R.J. and Handfield, M. (2010). Role of the ATM-checkpoint kinase 2 pathway in CDT-mediated apoptosis of gingival epithelial cells. *PLoS One* **5**, e11714.
- Albert, M.J., Faruque, S.M., Faruque, A.S., Bettelheim, K.A., Neogi, P.K., Bhuiyan, N.A. and Kaper, J.B. (1996). Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* **34**, 717-719.
- Alby, F., Mazars, R., de Rycke, J., Guillou, E., Baldin, V., Darbon, J.M. and Ducommun, B. (2001). Study of the cytolethal distending toxin (CDT)-activated cell cycle checkpoint. Involvement of the CHK2 kinase. *FEBS Lett* **491**, 261-265.
- Amant, F., Tousseyn, T., Coenegrachts, L., Decloedt, J., Moerman, P. and Debiec-Rychter, M. (2011). Case report of a poorly differentiated uterine tumour with t(10;17) translocation and neuroectodermal phenotype. *Anticancer Res* **31**, 2367-2371.
- Azad, A., Jackson, S., Cullinane, C., Natoli, A., Neilsen, P.M., Callen, D.F., *et al.* (2011). Inhibition of DNA-dependent protein kinase induces accelerated senescence in irradiated human cancer cells. *Mol Cancer Res* **9**, 1696-1707.
- Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D. and Zakian, V.A. (2009). Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **34**, 722-734.
- Bachrati, C.Z. and Hickson, I.D. (2009). Dissolution of double Holliday junctions by the concerted action of BLM and topoisomerase IIIalpha. *Methods Mol Biol* **582**, 91-102.
- Bae, I., Fan, S., Bhatia, K., Kohn, K.W., Fornace, A.J., Jr. and O'Connor, P.M. (1995). Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Res* **55**, 2387-2393.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.
- Ball, H.L., Ehrhardt, M.R., Mordes, D.A., Glick, G.G., Chazin, W.J. and Cortez, D. (2007). Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. *Mol Cell Biol* **27**, 3367-3377.
- Barber, L.J., Youds, J.L., Ward, J.D., McIlwraith, M.J., O'Neil, N.J., Petalcorin, M.I.R., *et al.* (2008). RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell* **135**, 261-271.

- Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., *et al.* (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **114**, 359-370.
- Bekker-Jensen, S., Danielsen, J.R., Fugger, K., Gromova, I., Nerstedt, A., Bartek, J., *et al.* (2009). HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nature Cell Biology* **12**, 80-86.
- Belibasakis, G.N., Mattsson, A., Wang, Y., Chen, C. and Johansson, A. (2004). Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. *APMIS* **112**, 674-685.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet* **4**, e1000110.
- Bennett, C.B., Lewis, A.L., Baldwin, K.K. and Resnick, M.A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5613-5617.
- Benton, E.R. and Benton, E.V. (2001). Beam Interactions with Materials and Atoms. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* **184**, 255-294.
- Bermejo, R., Doksan, Y., Capra, T., Katou, Y.M., Tanaka, H., Shirahige, K. and Foiani, M. (2007). Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes Dev* **21**, 1921-1936.
- Bianchi, V., Pontis, E. and Reichard, P. (1986). Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *J Biol Chem* **261**, 16037-16042.
- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T. and Karch, H. (2004). Cytolethal Distending Toxin from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Causes Irreversible G2/M Arrest, Inhibition of Proliferation, and Death of Human Endothelial Cells. *Infection and Immunity* **73**, 552-562.
- Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., *et al.* (2005). Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* **310**, 1821-1824.
- Boesze-Battaglia, K., Besack, D., McKay, T., Zekavat, A., Otis, L., Jordan-Sciutto, K. and Shenker, B.J. (2006). Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology* **8**, 823-836.
- Boesze-Battaglia, K., Brown, A., Walker, L., Besack, D., Zekavat, A., Wrenn, S., *et al.* (2009). Cytolethal Distending Toxin-induced Cell Cycle Arrest of Lymphocytes Is Dependent upon Recognition and Binding to Cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 10650-10658.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S. and Pommier, Y. (2008). GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 957-967.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**, 4682-4689.
- Botchway, S.W., Reynolds, P., Parker, A.W. and O'Neill, P. (2010). Use of near infrared femtosecond lasers as sub-micron radiation microbeam for cell DNA damage and repair studies. *Mutat Res* **704**, 38-44.

- Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 855-865.
- Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., *et al.* (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 688-695.
- Bovari, T. (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
- Bradbury, A.R. and Marks, J.D. (2004). Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods* **290**, 29-49.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 208-219.
- Bridges, B.A. and Woodgate, R. (1985). The two-step model of bacterial UV mutagenesis. *Mutat Res* **150**, 133-139.
- Broomfield, S., Hryciw, T. and Xiao, W. (2001). DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **486**, 167-184.
- Budman, J. and Chu, G. (2005). Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J* **24**, 849-860.
- Buis, J., Stoneham, T., Spehalski, E. and Ferguson, D.O. (2012). Mre11 regulates CtIP-dependent double-strand break repair by interaction with CDK2. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**, 246-252.
- Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Eckersdorff, M., *et al.* (2008). Mre11 Nuclease Activity Has Essential Roles in DNA Repair and Genomic Stability Distinct from ATM Activation. *Cell* **135**, 85-96.
- Bunting, Samuel F., Callén, E., Kozak, Marina L., Kim, Jung M., Wong, N., López-Contreras, Andrés J., *et al.* (2012). BRCA1 Functions Independently of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair. *Molecular Cell* **46**, 125-135.
- Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**, 243-254.
- Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., *et al.* (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* **104**, 263-269.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C. and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* **19**, 1040-1052.
- Cao, L., Volgina, A., Huang, C.-m., Korostoff, J. and DiRienzo, J.M. (2005). Characterization of point mutations in the *cdtA* gene of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Molecular Microbiology* **58**, 1303-1321.
- Capp, J.P., Boudsocq, F., Bertrand, P., Laroche-Clary, A., Pourquier, P., Lopez, B.S., *et al.* (2006). The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **34**, 2998-3007.

- Carette, J.E., Guimaraes, C.P., Varadarajan, M., Park, A.S., Wuethrich, I., Godarova, A., *et al.* (2009). Haploid Genetic Screens in Human Cells Identify Host Factors Used by Pathogens. *Science* **326**, 1231-1235.
- Carette, J.E., Guimaraes, C.P., Wuethrich, I., Blomen, V.A., Varadarajan, M., Sun, C., *et al.* (2011). Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes by deep sequencing. *Nature Biotechnology* **29**, 542-546.
- Casper, A.M., Nghiem, P., Arlt, M.F. and Glover, T.W. (2002). ATR regulates fragile site stability. *Cell* **111**, 779-789.
- Caussinus, E., Kanca, O. and Affolter, M. (2011). Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**, 117-121.
- Celeste, A. (2002). Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science* **296**, 922-927.
- Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M.J., Fernandez-Capetillo, O., Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., *et al.* (2003). H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* **114**, 371-383.
- Chan, S.W. and Blackburn, E.H. (2003). Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell* **11**, 1379-1387.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- Chapman, J.R., Sossick, A.J., Boulton, S.J. and Jackson, S.P. (2012). BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *J Cell Sci.*
- Chappell, C., Hanakahi, L.A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M. and West, S.C. (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J* **21**, 2827-2832.
- Chatterjee, S.K. and Zetter, B.R. (2005). Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol* **1**, 37-50.
- Chen, L., Nievera, C.J., Lee, A.Y. and Wu, X. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* **283**, 7713-7720.
- Cheng, Q., Barboule, N., Frit, P., Gomez, D., Bombarde, O., Couderc, B., *et al.* (2011). Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* **39**, 9605-9619.
- Cheng, W.H., Sakamoto, S., Fox, J.T., Komatsu, K., Carney, J. and Bohr, V.A. (2005). Werner syndrome protein associates with gamma H2AX in a manner that depends upon Nbs1. *FEBS Lett* **579**, 1350-1356.
- Choi, J.H., Lindsey-Boltz, L.A., Kemp, M., Mason, A.C., Wold, M.S. and Sancar, A. (2010). Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13660-13665.
- Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S. and Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* **20**, 801-809.
- Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., *et al.* (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell* **31**, 33-46.

- Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**, 179-204.
- Clare, G. (2012). The in vitro mammalian chromosome aberration test. *Methods Mol Biol* **817**, 69-91.
- Cleaver, J.E. (2011). γ H2Ax: Biomarker of Damage or Functional Participant in DNA Repair "All that Glitters Is not Gold!". *Photochemistry and Photobiology* **87**, 1230-1239.
- Cockayne, E.A. (1936). Dwarfism with retinal atrophy and deafness. *Arch Dis Child* **11**, 1-8.
- Comayras, C., Tasca, C., Peres, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E. and De Rycke, J. (1997). Escherichia coli cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect Immun* **65**, 5088-5095.
- Conrath, K.E., Wernery, U., Muyldermans, S. and Nguyen, V.K. (2003). Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol* **27**, 87-103.
- Constantinou, A., Chen, X.B., McGowan, C.H. and West, S.C. (2002). Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *EMBO J* **21**, 5577-5585.
- Cope, L.D., Lumbley, S., Latimer, J.L., Klesney-Tait, J., Stevens, M.K., Johnson, L.S., et al. (1997). A diffusible cytotoxin of Haemophilus ducreyi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4056-4061.
- Corcos, D., Osborn, M.J. and Matheson, L.S. (2011). B-cell receptors and heavy chain diseases: guilty by association? *Blood* **117**, 6991-6998.
- Cornelissen, B., Kersemans, V., Darbar, S., Thompson, J., Shah, K., Sleeth, K., et al. (2011). Imaging DNA damage in vivo using H2AX-targeted immunoconjugates. *Cancer Research*.
- Cortes-Bratti, X. (2000). The Haemophilus ducreyi Cytolethal Distending Toxin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis via the DNA Damage Checkpoint Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 5296-5302.
- Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergard, T. and Thelestam, M. (2000). Cellular internalization of cytolethal distending toxin from Haemophilus ducreyi. *Infect Immun* **68**, 6903-6911.
- Cortes-Bratti, X., Frisan, T. and Thelestam, M. (2001a). The cytolethal distending toxins induce DNA damage and cell cycle arrest. *Toxicon* **39**, 1729-1736.
- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergard, T., Thelestam, M. and Frisan, T. (2001b). The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J Biol Chem* **276**, 5296-5302.
- Cortez-Retamozo, V. (2004). Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate. *Cancer Research* **64**, 2853-2857.
- Cortez, D., Glick, G. and Elledge, S.J. (2004). Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10078-10083.
- Crosnier, C., Stamatakis, D. and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**, 349-359.

- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E. and Nougayrede, J.P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 11537-11542.
- da Silva, A.S. and da Silva Leite, D. (2002). Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. *Vet Microbiol* **89**, 195-199.
- Damek-Poprawa, M., Jang, J.Y., Volgina, A., Korostoff, J. and DiRienzo, J.M. (2012). Localization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin Subunits During Intoxication of Live Cells. *Infection and Immunity*.
- Davies, J. and Riechmann, L. (1994). 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS Lett* **339**, 285-290.
- de Feraudy, S., Revet, I., Bezrookove, V., Feeney, L. and Cleaver, J.E. (2010). A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 6870-6875.
- De Genst, E., Saerens, D., Muyldermans, S. and Conrath, K. (2006). Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol* **30**, 187-198.
- Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B. and Brison, O. (2012). Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in Genetics* **28**, 22-32.
- Decanniere, K., Muyldermans, S. and Wyns, L. (2000). Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? *J Mol Biol* **300**, 83-91.
- Denchi, E.L. and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* **448**, 1068-1071.
- Deng, K. and Hansen, E.J. (2003). A CdtA-CdtC Complex Can Block Killing of HeLa Cells by *Haemophilus ducreyi* Cytolethal Distending Toxin. *Infection and Immunity* **71**, 6633-6640.
- Deshpande, A.M. and Newlon, C.S. (1996). DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* **272**, 1030-1033.
- Deweese, J.E. and Osheroff, N. (2009). The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res* **37**, 738-748.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K. and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**, 2540-2551.
- Diderich, K., Alanazi, M. and Hoeijmakers, J.H.J. (2011). Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. *DNA Repair* **10**, 772-780.
- Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C.-Y., Mahowald, G., Chen, H.T., *et al.* (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature* **456**, 529-533.
- Dolk, E., van der Vaart, M., Lutje Hulsik, D., Vriend, G., de Haard, H., Spinelli, S., *et al.* (2005). Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl Environ Microbiol* **71**, 442-450.
- Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G.B., Xu, X. and Lees-Miller, S.P. (2010). Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol* **30**, 1368-1381.

- Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G.J., Hammel, M., *et al.* (2010). Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1255-1259.
- Drouet, J., Frit, P., Delteil, C., de Villartay, J.P., Salles, B. and Calsou, P. (2006). Interplay between Ku, Artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *J Biol Chem* **281**, 27784-27793.
- Durkin, S.G. and Glover, T.W. (2007). Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* **41**, 169-192.
- Eid, W., Steger, M., El-Shemerly, M., Ferretti, L.P., Pena-Diaz, J., Konig, C., *et al.* (2010). DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability. *EMBO Rep* **11**, 962-968.
- Ellestad, G.A. (2011). Structural and conformational features relevant to the anti-tumor activity of calicheamicin γ 1l. *Chirality* **23**, 660-671.
- Elmroth, K. (2003). Cleavage of cellular DNA by calicheamicin γ 1. *DNA Repair* **2**, 363-374.
- Elwell, C., Chao, K., Patel, K. and Dreyfus, L. (2001). Escherichia coli CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. *Infect Immun* **69**, 3418-3422.
- Elwell, C.A. and Dreyfus, L.A. (2000). DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol* **37**, 952-963.
- Eshraghi, A., Maldonado-Arocho, F.J., Gargi, A., Cardwell, M.M., Prouty, M.G., Blanke, S.R. and Bradley, K.A. (2010). Cytolethal Distending Toxin Family Members Are Differentially Affected by Alterations in Host Glycans and Membrane Cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 18199-18207.
- Falck, J., Coates, J. and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**, 605-611.
- Fan, S., Chang, J.K., Smith, M.L., Duba, D., Fornace, A.J., Jr. and O'Connor, P.M. (1997). Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene* **14**, 2127-2136.
- Fanconi, G. (1927). Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*, 257-280.
- Fedor, Y., Vignard, J., Nicolau-Travers, M.L., Boutet-Robinet, E., Watrin, C., Salles, B. and Mirey, G. (2012). From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the Escherichia coli Cytolethal Distending Toxin. *Cellular Microbiology*, n/a-n/a.
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E.R., Tissier, A., Coulon, S., *et al.* (2009). Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. *Cell* **138**, 78-89.
- Ferguson, D.O. and Alt, F.W. (2001). DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* **20**, 5572-5579.
- FitzGerald, Jennifer E., Grenon, M. and Lowndes, Noel F. (2009). 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochemical Society Transactions* **37**, 897.
- Fortune, J.M., Stith, C.M., Kissling, G.E., Burgers, P.M. and Kunkel, T.A. (2006). RPA and PCNA suppress formation of large deletion errors by yeast DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res* **34**, 4335-4341.

- Fox, J.G., Rogers, A.B., Whary, M.T., Ge, Z., Taylor, N.S., Xu, S., *et al.* (2004). Gastroenteritis in NF- κ B-Deficient Mice Is Produced with Wild-Type Campylobacter jejuni but Not with C. jejuni Lacking Cytolethal Distending Toxin despite Persistent Colonization with Both Strains. *Infection and Immunity* **72**, 1116-1125.
- Frampton, J., Irmisch, A., Green, C.M., Neiss, A., Trickey, M., Ulrich, H.D., *et al.* (2006). Postreplication repair and PCNA modification in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Biol Cell* **17**, 2976-2985.
- Franco, A.T., Johnston, E., Krishna, U., Yamaoka, Y., Israel, D.A., Nagy, T.A., *et al.* (2008). Regulation of Gastric Carcinogenesis by Helicobacter pylori Virulence Factors. *Cancer Research* **68**, 379-387.
- Freifelder, D. and Trumbo, B. (1969). Matching of single-strand breaks to form double-strand breaks in DNA. *Biopolymers* **7**, 681-693.
- Frenken, L.G., van der Linden, R.H., Hermans, P.W., Bos, J.W., Ruuls, R.C., de Geus, B. and Verrips, C.T. (2000). Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae. *J Biotechnol* **78**, 11-21.
- Frisan, T. (2001). Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses. *International Journal of Medical Microbiology* **291**, 495-499.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlow, B. and Thelestam, M. (2003). The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cellular Microbiology* **5**, 695-707.
- Frit, P. (2000). Ku Entry into DNA Inhibits Inward DNA Transactions in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 35684-35691.
- Fujimori, A., Tachiiri, S., Sonoda, E., Thompson, L.H., Dhar, P.K., Hiraoka, M., *et al.* (2001). Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **20**, 5513-5520.
- Fukuda, T., Sumiyoshi, T., Takahashi, M., Kataoka, T., Asahara, T., Inui, H., *et al.* (2001). Alterations of the double-strand break repair gene MRE11 in cancer. *Cancer Res* **61**, 23-26.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., *et al.* (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology* **14**, 355-365.
- Furuya, K., Poitelea, M., Guo, L., Caspari, T. and Carr, A.M. (2004). Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. *Genes Dev* **18**, 1154-1164.
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J. and Jackson, S.P. (2012). RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair. *Genes Dev* **26**, 1179-1195.
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Polo, S., Miller, K.M. and Jackson, S.P. (2009). Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* **462**, 935-939.
- Gali, H., Juhasz, S., Morocz, M., Hajdu, I., Fattyol, K., Szukacsov, V., *et al.* (2012). Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Research* **40**, 6049-6059.

- Garaicoechea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Saif, L., *et al.* (2008). Llama-Derived Single-Chain Antibody Fragments Directed to Rotavirus VP6 Protein Possess Broad Neutralizing Activity In Vitro and Confer Protection against Diarrhea in Mice. *Journal of Virology* **82**, 9753-9764.
- Ge, Z., Rogers, A.B., Feng, Y., Lee, A., Xu, S., Taylor, N.S. and Fox, J.G. (2007). Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cell Microbiol* **9**, 2070-2080.
- Gelfanova, V., Hansen, E.J. and Spinola, S.M. (1999). Cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* induces apoptotic death of Jurkat T cells. *Infect Immun* **67**, 6394-6402.
- Goldman, E.R., Anderson, G.P., Liu, J.L., Delehanty, J.B., Sherwood, L.J., Osborn, L.E., *et al.* (2006). Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem* **78**, 8245-8255.
- Goodman, L.S., Wintrobe, M.M. and *et al.* (1946). Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc* **132**, 126-132.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C. and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev* **22**, 2767-2772.
- Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E.W., Greulich, K.O., Cardoso, M.C. and Rapp, A. (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Research*.
- Gudkov, A.V. and Komarova, E.A. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature Reviews Cancer* **3**, 117-129.
- Gueorguieva, D., Li, S., Walsh, N., Mukerji, A., Tanha, J. and Pandey, S. (2006). Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J* **20**, 2636-2638.
- Guerra, L., Teter, K., Lilley, B.N., Stenerlow, B., Holmes, R.K., Ploegh, H.L., *et al.* (2005a). Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell Microbiol* **7**, 921-934.
- Guerra, L., Teter, K., Lilley, B.N., Stenerlöw, B., Holmes, R.K., Ploegh, H.L., *et al.* (2005b). Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cellular Microbiology* **7**, 921-934.
- Guidi, R., Guerra, L., Levi, L., Stenerlow, B., Fox, J.G., Josenhans, C., *et al.* (2012). Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell Microbiol*.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X. and Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* **14**, 2745-2756.
- Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., *et al.* (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234-238.

- Haber, J.E., Akamatsu, Y. and Jasin, M. (2010). Role for the Mammalian Swi5-Sfr1 Complex in DNA Strand Break Repair through Homologous Recombination. *PLoS Genetics* **6**, e1001160.
- Haghighi, E. (2004). Salmonella typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 4614-4619.
- Haince, J.F., Kozlov, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Hendzel, M.J., Lavin, M.F. and Poirier, G.G. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **282**, 16441-16453.
- Haince, J.F., McDonald, D., Rodrigue, A., Dery, U., Masson, J.Y., Hendzel, M.J. and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* **283**, 1197-1208.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., *et al.* (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448.
- Hammel, M., Yu, Y., Mahaney, B.L., Cai, B., Ye, R., Phipps, B.M., *et al.* (2010). Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J Biol Chem* **285**, 1414-1423.
- Han, L. and Yu, K. (2008). Altered kinetics of nonhomologous end joining and class switch recombination in ligase IV-deficient B cells. *J Exp Med* **205**, 2745-2753.
- Hanahan, D. and Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Hanasoge, S. and Ljungman, M. (2007). H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* **28**, 2298-2304.
- Hansemann, D.v. (1903). *Virchows Arch A Pathol Anat.*
- Harmsen, M.M. and De Haard, H.J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 13-22.
- Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Nijman, I.J., Niewold, T.A., Frenken, L.G. and de Geus, B. (2000). Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol* **37**, 579-590.
- Harmsen, M.M., Solt, C.B., Zijderfeld-van Bommel, A.M., Niewold, T.A. and Zijderfeld, F.G. (2006). Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 544-551.
- Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell* **28**, 739-745.
- Harrigan, J.A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R., *et al.* (2011). Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *The Journal of Cell Biology* **193**, 97-108.
- Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828.

- Hassane, D.C., Lee, R.B. and Pickett, C.L. (2003). Campylobacter jejuni Cytolethal Distending Toxin Promotes DNA Repair Responses in Normal Human Cells. *Infection and Immunity* **71**, 541-545.
- Helleday, T. (2011). The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* **5**, 387-393.
- Heller, R.C. and Marians, K.J. (2006). Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 932-943.
- Heo, K., Kim, H., Choi, S.H., Choi, J., Kim, K., Gu, J., *et al.* (2008). FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Mol Cell* **30**, 86-97.
- Hickson, I. (2004). Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM. *Cancer Research* **64**, 9152-9159.
- Hmila, I., Abdallah R, B.A.-B., Saerens, D., Benlasfar, Z., Conrath, K., Ayeb, M.E., *et al.* (2008). VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin Aahl'. *Molecular Immunology* **45**, 3847-3856.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141.
- Hofmann, A., Conway, J.O., Sherwood, L.J., Collazo, M.T., Garza, J.A. and Hayhurst, A. (2010). Llama Single Domain Antibodies Specific for the 7 Botulinum Neurotoxin Serotypes as Heptaplex Immunoreagents. *PLoS One* **5**, e8818.
- Holliger, P. and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1126-1136.
- Horiguchi, Y., Sugimoto, N. and Matsuda, M. (1993). Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by Bordetella bronchiseptica dermonecrotic toxin. *Infect Immun* **61**, 3611-3615.
- Huang, L., Gainkam, L.O.T., Cavelliers, V., Vanhove, C., Keyaerts, M., Baetselier, P., *et al.* (2008). SPECT Imaging with 99mTc-Labeled EGFR-Specific Nanobody for In Vivo Monitoring of EGFR Expression. *Molecular Imaging and Biology* **10**, 167-175.
- Huang, L., Reekmans, G., Saerens, D., Friedt, J.-M., Frederix, F., Francis, L., *et al.* (2005). Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 483-490.
- Huang, L.C., Clarkin, K.C. and Wahl, G.M. (1996). Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4827-4832.
- Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B. and Chen, J. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* **131**, 901-914.
- Huen, M.S.Y., Sy, S.M.H. and Chen, J. (2009). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 138-148.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D. and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of γ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *The EMBO Journal* **29**, 1446-1457.

- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., *et al.* (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* **27**, 7028-7040.
- Iwabuchi, K., Basu, B.P., Kysela, B., Kurihara, T., Shibata, M., Guan, D., *et al.* (2003). Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. *J Biol Chem* **278**, 36487-36495.
- Jankowska, A.M., Gondek, L.P., Szpurka, H., Nearman, Z.P., Tiu, R.V. and Maciejewski, J.P. (2008). Base excision repair dysfunction in a subgroup of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **22**, 551-558.
- Jazayeri, A., Balestrini, A., Garner, E., Haber, J.E. and Costanzo, V. (2008). Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *EMBO J* **27**, 1953-1962.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J. and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**, 37-45.
- Jeggo, P. and O'Neill, P. (2002). The Greek Goddess, Artemis, reveals the secrets of her cleavage. *DNA Repair (Amst)* **1**, 771-777.
- Jensen, R.B., Carreira, A. and Kowalczykowski, S.C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* **467**, 678-683.
- Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S. and Duhamel, G.E. (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* **157**, 1851-1875.
- Joern, J.M. (2003). DNA shuffling. *Methods Mol Biol* **231**, 85-89.
- Johnson, W.M. and Lior, H. (1988). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb Pathog* **4**, 103-113.
- Jones, R.M. and Petermann, E. (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J* **443**, 13-26.
- Kamileri, I., Karakasilioti, I. and Garinis, G.A. (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends in Genetics*.
- Kannouche, P.L., Wing, J. and Lehmann, A.R. (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* **14**, 491-500.
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A. and Lahav, G. (2012). Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol Cell* **47**, 320-329.
- Karnani, N. and Dutta, A. (2011). The effect of the intra-S-phase checkpoint on origins of replication in human cells. *Genes & Development* **25**, 621-633.
- Karras, G.I. and Jentsch, S. (2010). The RAD6 DNA Damage Tolerance Pathway Operates Uncoupled from the Replication Fork and Is Functional Beyond S Phase. *Cell* **141**, 255-267.
- Kastan, M.B. and Lim, D.S. (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 179-186.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**, 6304-6311.

- Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, Y.M., Harada, K., Kikuchi, K., *et al.* (2005). Dual roles for DNA polymerase η in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Mol Cell* **20**, 793-799.
- Khodursky, A.B., Fan, H.-F., Cox, M.M. and Li, H.-W. (2011). Developing Single-Molecule TPM Experiments for Direct Observation of Successful RecA-Mediated Strand Exchange Reaction. *PLoS One* **6**, e21359.
- Kim, C., Paulus, B.F. and Wold, M.S. (1994). Interactions of human replication protein A with oligonucleotides. *Biochemistry* **33**, 14197-14206.
- Klooster, R., Maassen, B.T., Stam, J.C., Hermans, P.W., Ten Haaf, M.R., Detmers, F.J., *et al.* (2007). Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology. *J Immunol Methods* **324**, 1-12.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Chen, B., Burma, S., Tashiro, S., Matsuura, S., *et al.* (2009). Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 752-757.
- Koch, C.A., Agyei, R., Galicia, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Starostine, A., *et al.* (2004). Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J* **23**, 3874-3885.
- Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., *et al.* (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**, 1637-1640.
- Kong, X., Mohanty, S.K., Stephens, J., Heale, J.T., Gomez-Godinez, V., Shi, L.Z., *et al.* (2009). Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **37**, e68.
- Krüger, C., Hultberg, A., Marcotte, H., Hermans, P., Bezemer, S., Frenken, L.G.J. and Hammarström, L. (2006). Therapeutic effect of llama derived VHH fragments against *Streptococcus mutans* on the development of dental caries. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 732-737.
- Kuhfittig-Kulle, S., Feldmann, E., Odersky, A., Kuliczowska, A., Goedecke, W., Eggert, A. and Pfeiffer, P. (2007). The mutagenic potential of non-homologous end joining in the absence of the NHEJ core factors Ku70/80, DNA-PKcs and XRCC4-LigIV. *Mutagenesis* **22**, 217-233.
- Kumagai, A. and Dunphy, W.G. (2000). Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* **6**, 839-849.
- La Spada, A.R., Roling, D.B., Harding, A.E., Warner, C.L., Spiegel, R., Hausmanowa-Petrusewicz, I., *et al.* (1992). Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet* **2**, 301-304.
- Labib, K., Tercero, J.A. and Diffley, J.F. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* **288**, 1643-1647.
- Ladenson, R.C., Crimmins, D.L., Landt, Y. and Ladenson, J.H. (2006). Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. *Anal Chem* **78**, 4501-4508.
- Lafaye, P., Achour, I., England, P., Duyckaerts, C. and Rougeon, F. (2009). Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol Immunol* **46**, 695-704.

- Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D.M., Martin, B. and Carr, A.M. (2005). Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* **121**, 689-702.
- Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., *et al.* (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13738-13743.
- Lara-Tejero, M. and Galan, J.E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* **290**, 354-357.
- Laufs, U., Marra, D., Node, K. and Liao, J.K. (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* **274**, 21926-21931.
- Lax, A.J. and Thomas, W. (2002). How bacteria could cause cancer: one step at a time. *Trends Microbiol* **10**, 293-299.
- Lazzaro, F., Sapountzi, V., Granata, M., Pelliccioli, A., Vaze, M., Haber, J.E., *et al.* (2008). Histone methyltransferase Dot1 and Rad9 inhibit single-stranded DNA accumulation at DSBs and uncapped telomeres. *EMBO J* **27**, 1502-1512.
- Lee, H.-S., Park, J.-H., Kim, S.-J., Kwon, S.-J. and Kwon, J. (2010). A cooperative activation loop among SWI/SNF, γ -H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *The EMBO Journal* **29**, 1434-1445.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551-554.
- Lehmann, A.R. (2001). The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes & Development* **15**, 15-23.
- Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., *et al.* (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* **6**, 891-899.
- Li, G.-M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* **18**, 85-98.
- Li, L., Sharipo, A., Chaves-Olarte, E., Masucci, M.G., Levitsky, V., Thelestam, M. and Frisan, T. (2002). The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell Microbiol* **4**, 87-99.
- Li, W., Li, F., Huang, Q., Shen, J., Wolf, F., He, Y., *et al.* (2011). Quantitative, Noninvasive Imaging of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks In Vivo. *Cancer Research* **71**, 4130-4137.
- Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J. and Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* **41**, 98-105.
- Lieber, M.R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N. and Tsai, A.G. (2010). Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem* **50**, 279-296.
- Lieber, M.R. and Karanjawala, Z.E. (2004). Ageing, repetitive genomes and DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 69-75.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 712-720.

- Lima, V.P., Lima, M.A.P.d., Ferreira, M.V.P., Barros, M.A.P. and Rabenhorst, S.H.B. (2010). The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *International Journal of Infectious Diseases* **14**, e613-e617.
- Limoli, C.L., Giedzinski, E., Bonner, W.M. and Cleaver, J.E. (2002). UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 233-238.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Lingle, W.L., Barrett, S.L., Negron, V.C., D'Assoro, A.B., Boeneman, K., Liu, W., *et al.* (2002). Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1978-1983.
- Liu, N. (2002). XRCC2 is Required for the Formation of Rad51 Foci Induced by Ionizing Radiation and DNA Cross-Linking Agent Mitomycin C. *J Biomed Biotechnol* **2**, 106-113.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., *et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**, 1448-1459.
- Liyanage, N.P., Manthey, K.C., Dassanayake, R.P., Kuszynski, C.A., Oakley, G.G. and Duhamel, G.E. (2010). *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin causes cell death in intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter* **15**, 98-107.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., *et al.* (2006). MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Molecular Cell* **21**, 187-200.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J. and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**, 255-260.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Sølvhøj Pedersen, R., *et al.* (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nature Cell Biology* **13**, 243-253.
- Lundin, C., Erixon, K., Arnaudeau, C., Schultz, N., Jenssen, D., Meuth, M. and Helleday, T. (2002). Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **22**, 5869-5878.
- Maass, D.R., Sepulveda, J., Pernthaner, A. and Shoemaker, C.B. (2007). Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods* **324**, 13-25.
- Machado, A.M.D., Figueiredo, C., Seruca, R. and Rasmussen, L.J. (2010). *Helicobacter pylori* infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1806**, 58-65.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H.R. and Medema, R.H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene* **29**, 2281-2291.

- Mahaney, Brandi L., Meek, K. and Lees-Miller, Susan P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal* **417**, 639.
- Mailand, N. (2000). Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science* **288**, 1425-1429.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C. and Lukas, J. (2007). RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* **131**, 887-900.
- Manis, J.P., Morales, J.C., Xia, Z., Kutok, J.L., Alt, F.W. and Carpenter, P.B. (2004). 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nature Immunology* **5**, 481-487.
- Mao, X. and DiRienzo, J.M. (2002). Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cell Microbiol* **4**, 245-255.
- Marches, O., Ledger, T.N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., *et al.* (2003). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol* **50**, 1553-1567.
- Marheineke, K. (2004). Control of Replication Origin Density and Firing Time in *Xenopus* Egg Extracts: ROLE OF A CAFFEINE-SENSITIVE, ATR-DEPENDENT CHECKPOINT. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 28071-28081.
- Mari, P.O., Florea, B.I., Persengiev, S.P., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Modesti, M., *et al.* (2006). Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18597-18602.
- Martin, G.M., Smith, A.C., Ketterer, D.J., Ogburn, C.E. and Disteché, C.M. (1985). Increased chromosomal aberrations in first metaphases of cells isolated from the kidneys of aged mice. *Isr J Med Sci* **21**, 296-301.
- Martin, V., Chahwan, C., Gao, H., Blais, V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, *et al.* (2006). Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *EMBO J* **25**, 2564-2574.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160-1166.
- Mattiroli, F., Vissers, Joseph H.A., van Dijk, Willem J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., *et al.* (2012). RNF168 Ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to Drive DNA Damage Signaling. *Cell* **150**, 1182-1195.
- Mayer, M.P., Bueno, L.C., Hansen, E.J. and DiRienzo, J.M. (1999). Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **67**, 1227-1237.
- McCulloch, S.D. and Kunkel, T.A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res* **18**, 148-161.
- McGlynn, P. and Lloyd, R.G. (2002). Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 859-870.
- McIlwraith, M.J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R. and West, S.C. (2005). Human DNA polymerase η promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell* **20**, 783-792.

- McIlwraith, M.J., Van Dyck, E., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A. and West, S.C. (2000). Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J Mol Biol* **304**, 151-164.
- McIntosh, J.R., Shu, X., Lev-Ram, V., Deerinck, T.J., Qi, Y., Ramko, E.B., *et al.* (2011). A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms. *PLoS Biology* **9**, e1001041.
- McSweeney, L.A. and Dreyfus, L.A. (2004). Nuclear localization of the Escherichia coli cytolethal distending toxin CdtB subunit. *Cellular Microbiology* **6**, 447-458.
- McSweeney, L.A. and Dreyfus, L.A. (2005). Carbohydrate-Binding Specificity of the Escherichia coli Cytolethal Distending Toxin CdtA-II and CdtC-II Subunits. *Infection and Immunity* **73**, 2051-2060.
- Meddeb-Mouelhi, F., Bouhaouala-Zahar, B., Benlasfar, Z., Hammadi, M., Mejri, T., Moslah, M., *et al.* (2003). Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing Androctonus australis hector scorpion toxins. *Toxicon* **42**, 785-791.
- Meek, K., Dang, V. and Lees-Miller, S.P. (2008). Chapter 2 DNA-PK. **99**, 33-58.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., *et al.* (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71.
- Mirkin, E.V. and Mirkin, S.M. (2007). Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 13-35.
- Mirkin, S.M. (2006). DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 351-358.
- Moeller, B.J., Sidman, R.L., Pasqualini, R. and Arap, W. (2011). Discovery of DNA repair inhibitors by combinatorial library profiling. *Cancer Res* **71**, 1816-1824.
- Mok, M.T. and Henderson, B.R. (2010). A comparison of BRCA1 nuclear localization with 14 DNA damage response proteins and domains: identification of specific differences between BRCA1 and 53BP1 at DNA damage-induced foci. *Cell Signal* **22**, 47-56.
- Moldovan, G.-L., Dejsuphong, D., Petalcorin, Mark I.R., Hofmann, K., Takeda, S., Boulton, Simon J. and D'Andrea, Alan D. (2012). Inhibition of Homologous Recombination by the PCNA-Interacting Protein PARI. *Molecular Cell* **45**, 75-86.
- Monegal, A., Olichon, A., Bery, N., Filleron, T., Favre, G. and Marco, A.d. (2011). Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (Lama glama) naïve libraries. *Developmental & Comparative Immunology*.
- Moon, S.H., Lin, L., Zhang, X., Nguyen, T.A., Darlington, Y., Waldman, A.S., *et al.* (2010). Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *J Biol Chem* **285**, 12935-12947.
- Morris, J.R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., *et al.* (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* **462**, 886-890.
- Motegi, A., Sood, R., Moinova, H., Markowitz, S.D., Liu, P.P. and Myung, K. (2006). Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J Cell Biol* **175**, 703-708.
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H. and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* **4**, 511-518.

- Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* **74**, 277-302.
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A. and Hamers, R. (1994). Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* **7**, 1129-1135.
- Muyldermans, S., Cambillau, C. and Wyns, L. (2001). Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci* **26**, 230-235.
- Muyldermans, S. and Lauwereys, M. (1999). Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognit* **12**, 131-140.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R. and Gloor, G.B. (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol Cell Biol* **14**, 1613-1625.
- Nesic, D., Hsu, Y. and Stebbins, C.E. (2004). Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature* **429**, 429-433.
- Nesic, D. and Stebbins, C.E. (2005). Mechanisms of Assembly and Cellular Interactions for the Bacterial Genotoxin CDT. *PLoS Pathogens* **1**, e28.
- Nguyen, V.K., Desmyter, A. and Muyldermans, S. (2001). Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv Immunol* **79**, 261-296.
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L. and Muyldermans, S. (1999). Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol* **36**, 515-524.
- Nguyen, V.K., Muyldermans, S. and Hamers, R. (1998). The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J Mol Biol* **275**, 413-418.
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., et al. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* **25**, 350-362.
- Nimonkar, A.V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P. and Kowalczykowski, S.C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16906-16911.
- Nishikubo, S., Ohara, M., Ueno, Y., Ikura, M., Kurihara, H., Komatsuzawa, H., et al. (2003). An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J Biol Chem* **278**, 50671-50681.
- Nougayrede, J.P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., et al. (2006). Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**, 848-851.
- O'Driscoll, M., Dobyns, W.B., van Hagen, J.M. and Jeggo, P.A. (2007). Cellular and clinical impact of haploinsufficiency for genes involved in ATR signaling. *Am J Hum Genet* **81**, 77-86.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A. and Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* **33**, 497-501.

- Ohara, M., Oswald, E. and Sugai, M. (2004). Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. *J Biochem* **136**, 409-413.
- Okuda, J., Fukumoto, M., Takeda, Y. and Nishibuchi, M. (1997). Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* **65**, 428-433.
- Olavarrieta, L., Hernandez, P., Krimer, D.B. and Schwartzman, J.B. (2002). DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J Mol Biol* **322**, 1-6.
- Olichon, A. and de Marco, A. (2012). Preparation of a naive library of camelid single domain antibodies. *Methods Mol Biol* **911**, 65-78.
- Orr-Weaver, T.L. and Szostak, J.W. (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4417-4421.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. and Rothstein, R.J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6354-6358.
- Padlan, E.A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* **31**, 169-217.
- Pan-Hammarstrom, Q. (2005). Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 189-194.
- Paull, T.T. and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **1**, 969-979.
- Peasland, A., Wang, L.Z., Rowling, E., Kyle, S., Chen, T., Hopkins, A., *et al.* (2011). Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *British Journal of Cancer* **105**, 372-381.
- Peek, R.M., Jr. and Blaser, M.J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* **2**, 28-37.
- Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L. and Stanbridge, E.J. (1996). DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15209-15214.
- Pellis, M., Pardon, E., Zolghadr, K., Rothbauer, U., Vincke, C., Kinne, J., *et al.* (2012). A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P. and Doxsey, S.J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* **58**, 3974-3985.
- Pingoud, A. and Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **29**, 3705-3727.
- Plosky, B.S., Vidal, A.E., Fernandez de Henestrosa, A.R., McLenigan, M.P., McDonald, J.P., Mead, S. and Woodgate, R. (2006). Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ι and η via interactions with ubiquitin. *EMBO J* **25**, 2847-2855.
- Pollithy, A., Romer, T., Lang, C., Muller, F.D., Helma, J., Leonhardt, H., *et al.* (2011a). Magnetosome expression of functional camelid antibody fragments (nanobodies) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and Environmental Microbiology*.

- Pollithy, A., Romer, T., Lang, C., Muller, F.D., Helma, J., Leonhardt, H., *et al.* (2011b). Magnetosome Expression of Functional Camelid Antibody Fragments (Nanobodies) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 6165-6171.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer* **6**, 789-802.
- Purdy, D., Buswell, C.M., Hodgson, A.E., McAlpine, K., Henderson, I. and Leach, S.A. (2000). Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J Med Microbiol* **49**, 473-479.
- Purvis, J.E., Karhohs, K.W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A. and Lahav, G. (2012). p53 Dynamics Control Cell Fate. *Science* **336**, 1440-1444.
- Rahbarizadeh, F., Ahmadvand, D. and Sharifzadeh, Z. (2011). Nanobody; an old concept and new vehicle for immunotargeting. *Immunol Invest* **40**, 299-338.
- Rajan, J.V., Wang, M., Marquis, S.T. and Chodosh, L.A. (1996). Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13078-13083.
- Rass, U., Compton, S.A., Matos, J., Singleton, M.R., Ip, S.C.Y., Blanco, M.G., *et al.* (2010). Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes & Development* **24**, 1559-1569.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* **300**, 149-152.
- Redon, C. (2010). Histone γ H2AX and Poly(ADP-Ribose) as Clinical Pharmacodynamic Biomarkers. *Clin Cancer Res*.
- Reinhardt, H.C. and Yaffe, M.B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 245-255.
- Riballo, E., Woodbine, L., Stiff, T., Walker, S.A., Goodarzi, A.A. and Jeggo, P.A. (2009). XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res* **37**, 482-492.
- Ricciardone, M.D., Ozcelik, T., Cevher, B., Ozdag, H., Tuncer, M., Gurgey, A., *et al.* (1999). Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res* **59**, 290-293.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 402-412.
- Robbins, J.H., Kraemer, K.H., Lutzner, M.A., Festoff, B.W. and Coon, H.G. (1974). Xeroderma pigmentosum. An inherited diseases with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair. *Ann Intern Med* **80**, 221-248.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**, 905-916.
- Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. and Bonner, W.M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* **275**, 9390-9395.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-5868.

- Rogers, A., Boutin, S., Whary, M., Sundina, N., Ge, Z., Cormier, K. and Fox, J. (2004). Progression of Chronic Hepatitis and Preneoplasia in *Helicobacter hepaticus*-Infected A/JCr Mice. *Toxicologic Pathology* **32**, 668-677.
- Roos, W.P. and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**, 440-450.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M.C. and Leonhardt, H. (2008). A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics* **7**, 282-289.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., *et al.* (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature Methods* **3**, 887-889.
- Rothkamm, K. and Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5057-5062.
- Rozengurt, E., Higgins, T., Chanter, N., Lax, A.J. and Staddon, J.M. (1990). Pasteurella multocida toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 123-127.
- Saerens, D., Kinne, J., Bosmans, E., Wernery, U., Muyldermans, S. and Conrath, K. (2004). Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J Biol Chem* **279**, 51965-51972.
- Saintigny, Y., Delacote, F., Vares, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbek, D. and Lopez, B.S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J* **20**, 3861-3870.
- Sak, A. and Stuschke, M. (2010). Use of gammaH2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* **20**, 223-231.
- Sale, J.E., Lehmann, A.R. and Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 141-152.
- Sanchez, A., Sharma, S., Rozenzhak, S., Roguev, A., Krogan, N.J., Chabes, A. and Russell, P. (2012). Replication Fork Collapse and Genome Instability in dCMP Deaminase Mutant. *Molecular and Cellular Biology*.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., *et al.* (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509-514.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., *et al.* (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**, 1749-1753.
- Schmidt, T.G.M. and Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols* **2**, 1528-1535.
- Schornack, S., Fuchs, R., Huitema, E., Rothbauer, U., Lipka, V. and Kamoun, S. (2009). Protein mislocalization in plant cells using a GFP-binding chromobody. *Plant J* **60**, 744-754.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 517-528.
- Scott, D.A. and Kaper, J.B. (1994). Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* **62**, 244-251.

- Sedelnikova, O.A. and Bonner, W.M. (2006). GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle* **5**, 2909-2913.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G. and Bonner, W.M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* **158**, 486-492.
- Seligmann, M., Danon, F., Hurez, D., Mihaesco, E. and Preud'homme, J.L. (1968). Alpha-chain disease: a new immunoglobulin abnormality. *Science* **162**, 1396-1397.
- Serruys, B., Van Houtte, F., Farhoudi-Moghadam, A., Leroux-Roels, G. and Vanlandschoot, P. (2010). Production, characterization and in vitro testing of HBcAg-specific VHH intrabodies. *J Gen Virol* **91**, 643-652.
- Sert, V., Cans, C., Tasca, C., Bret-Bennis, L., Oswald, E., Ducommun, B. and De Rycke, J. (1999). The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers a G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks. *Oncogene* **18**, 6296-6304.
- Shakya, R., Reid, L.J., Reczek, C.R., Cole, F., Egli, D., Lin, C.S., *et al.* (2011). BRCA1 Tumor Suppression Depends on BRCT Phosphoprotein Binding, But Not Its E3 Ligase Activity. *Science* **334**, 525-528.
- Shao, G., Lilli, D.R., Patterson-Fortin, J., Coleman, K.A., Morrissey, D.E. and Greenberg, R.A. (2009). The Rap80-BRCC36 de-ubiquitinating enzyme complex antagonizes RNF8-Ubc13-dependent ubiquitination events at DNA double strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 3166-3171.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D. and Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature Protocols* **2**, 1445-1457.
- Shenker, B.J., Demuth, D.R. and Zekavat, A. (2006). Exposure of Lymphocytes to High Doses of Actinobacillus actinomycetemcomitans Cytolethal Distending Toxin Induces Rapid Onset of Apoptosis-Mediated DNA Fragmentation. *Infection and Immunity* **74**, 2080-2092.
- Shenker, B.J., Hoffmaster, R.H., Zekavat, A., Yamaguchi, N., Lally, E.T. and Demuth, D.R. (2001). Induction of apoptosis in human T cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J Immunol* **167**, 435-441.
- Sigurdsson, S., Van Komen, S., Bussen, W., Schild, D., Albala, J.S. and Sung, P. (2001). Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev* **15**, 3308-3318.
- Solinger, J.A., Kiianitsa, K. and Heyer, W.D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol Cell* **10**, 1175-1188.
- Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., *et al.* (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* **17**, 598-608.
- Soria, G., Polo, S.E. and Almouzni, G. (2012). Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell* **46**, 722-734.
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P. and de Villartay, J.P. (2007a). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* **26**, 7780-7791.

- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P. and de Villartay, J.P. (2007b). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* **26**, 7780-7791.
- Spanò, S., Ugalde, J.E. and Galán, J.E. (2008). Delivery of a Salmonella Typhi Exotoxin from a Host Intracellular Compartment. *Cell Host & Microbe* **3**, 30-38.
- Srivastava, N., Gochhait, S., Gupta, P. and Bamezai, R.N. (2008). Copy number alterations of the H2AFX gene in sporadic breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* **180**, 121-128.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E. and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* **26**, 261-292.
- Stelter, P. and Ulrich, H.D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**, 188-191.
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., *et al.* (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* **99**, 577-587.
- Stewart, G.S., Stankovic, T., Byrd, P.J., Wechsler, T., Miller, E.S., Huissoon, A., *et al.* (2007). RIDDLE immunodeficiency syndrome is linked to defects in 53BP1-mediated DNA damage signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16910-16915.
- Stewart, M., Baker, R.P., Bayliss, R., Clayton, L., Grant, R.P., Littlewood, T. and Matsuura, Y. (2001). Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett* **498**, 145-149.
- Stijlemans, B. (2003). Efficient Targeting of Conserved Cryptic Epitopes of Infectious Agents by Single Domain Antibodies: AFRICAN TRYPANOSOMES AS PARADIGM. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 1256-1261.
- Stukenberg, P.T., Studwell-Vaughan, P.S. and O'Donnell, M. (1991). Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **266**, 11328-11334.
- Suerbaum, S., Josenhans, C., Sterzenbach, T., Drescher, B., Brandt, P., Bell, M., *et al.* (2003). The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7901-7906.
- Sugiyama, T., Zaitseva, E.M. and Kowalczykowski, S.C. (1997). A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem* **272**, 7940-7945.
- Sundrud, M.S. (2004). Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 7727-7732.
- Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S. and Sehorn, M.G. (2003). Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem* **278**, 42729-42732.
- Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O'Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair. *Cell* **138**, 63-77.
- Sy, S.M.H., Huen, M.S.Y. and Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 7155-7160.
- Syljuasen, R.G., Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., *et al.* (2005). Inhibition of Human Chk1 Causes Increased Initiation of DNA

- Replication, Phosphorylation of ATR Targets, and DNA Breakage. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 3553-3562.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25-35.
- Takai, H., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2003). DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Current Biology* **13**, 1549-1556.
- Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H.D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A.P., *et al.* (2007). Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A* **71**, 648-661.
- Tanha, J., Dubuc, G., Hiram, T., Narang, S.A. and MacKenzie, C.R. (2002). Selection by phage display of llama conventional V(H) fragments with heavy chain antibody V(H)H properties. *J Immunol Methods* **263**, 97-109.
- Teh, Y.H. and Kavanagh, T.A. (2010). High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*. *Transgenic Res* **19**, 575-586.
- Thibodeau, S.N., Bren, G. and Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**, 816-819.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., *et al.* (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**, 152-157.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., *et al.* (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6236-6240.
- Turner, G., Daniel, A. and Frost, M. (1980). X-linked mental retardation, macroorchidism, and the Xq27 fragile site. *J Pediatr* **96**, 837-841.
- Ueno, Y., Ohara, M., Kawamoto, T., Fujiwara, T., Komatsuzawa, H., Oswald, E. and Sugai, M. (2006). Biogenesis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Cytotoxic Distending Toxin Holotoxin. *Infection and Immunity* **74**, 3480-3487.
- Ulrich, H.D. (2011). Timing and spacing of ubiquitin-dependent DNA damage bypass. *FEBS Lett* **585**, 2861-2867.
- Ungar-Waron, H., Yagil, R., Brenner, J., Paz, R., Partosh, N., Van Creveld, C., *et al.* (2003). Reactions of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of camels with monoclonal antibodies against ruminant leukocytes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**, 137-143.
- Unsal-Kacmaz, K., Chastain, P.D., Qu, P.P., Minoo, P., Cordeiro-Stone, M., Sancar, A. and Kaufmann, W.K. (2007). The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol* **27**, 3131-3142.
- Unsal-Kacmaz, K., Mullen, T.E., Kaufmann, W.K. and Sancar, A. (2005). Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Mol Cell Biol* **25**, 3109-3116.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L. and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* **22**, 5612-5621.

- van Attikum, H. and Gasser, S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in Cell Biology* **19**, 207-217.
- van der Burg, M., van Dongen, J.J. and van Gent, D.C. (2009). DNA-PKcs deficiency in human: long predicted, finally found. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**, 503-509.
- van der Linden, R.H., de Geus, B., Frenken, G.J., Peters, H. and Verrips, C.T. (2000). Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution. *J Biotechnol* **80**, 261-270.
- van Veelen, L.R., Cervelli, T., van de Rakt, M.W., Theil, A.F., Essers, J. and Kanaar, R. (2005). Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. *Mutat Res* **574**, 22-33.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., Saar, K., *et al.* (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* **93**, 467-476.
- Verkaik, N.S., Esveltd-van Lange, R.E., van Heemst, D., Bruggenwirth, H.T., Hoeijmakers, J.H., Zdzienicka, M.Z. and van Gent, D.C. (2002). Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Eur J Immunol* **32**, 701-709.
- Virgin, J.B., Bailey, J.P., Hasteh, F., Neville, J., Cole, A. and Tromp, G. (2001). Crossing over is rarely associated with mitotic intragenic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **157**, 63-77.
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L. and Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* **34**, 1121-1131.
- Walker, J.R., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607-614.
- Walter, J. and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* **5**, 617-627.
- Wang, B., Hurov, K., Hofmann, K. and Elledge, S.J. (2009). NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes & Development* **23**, 729-739.
- Wang, H. (2005). DNA Ligase III as a Candidate Component of Backup Pathways of Nonhomologous End Joining. *Cancer Research* **65**, 4020-4030.
- Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 430-440.
- Ward, I.M. (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. *The Journal of Cell Biology* **165**, 459-464.
- Ward, I.M. and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**, 47759-47762.
- Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G. and Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* **278**, 19579-19582.
- Ward, J.D., Muzzini, D.M., Petalcorin, M.I.R., Martinez-Perez, E., Martin, J.S., Plevani, P., *et al.* (2010). Overlapping Mechanisms Promote Postsynaptic RAD-51

- Filament Disassembly during Meiotic Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell* **37**, 259-272.
- Waters, L.S., Minesinger, B.K., Wiltrott, M.E., D'Souza, S., Woodruff, R.V. and Walker, G.C. (2009). Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 134-154.
- Weemaes, C.M., Hustinx, T.W., Scheres, J.M., van Munster, P.J., Bakkeren, J.A. and Taalman, R.D. (1981). A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* **70**, 557-564.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., *et al.* (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* **198**, 157-174.
- West, S.C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 435-445.
- Willers, H., Xia, F. and Powell, S.N. (2002). Recombinational DNA Repair in Cancer and Normal Cells: The Challenge of Functional Analysis. *J Biomed Biotechnol* **2**, 86-93.
- Williams, H.L., Gottesman, M.E. and Gautier, J. (2012). Replication-independent repair of DNA interstrand crosslinks. *Mol Cell* **47**, 140-147.
- Williams, R.S., Williams, J.S. and Tainer, J.A. (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* **85**, 509-520.
- Winichayakul, S., Pernthaner, A., Scott, R., Vlaming, R. and Roberts, N. (2009). Head-to-tail fusions of camelid antibodies can be expressed in planta and bind in rumen fluid. *Biotechnol Appl Biochem* **53**, 111-122.
- Wold, M.S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* **66**, 61-92.
- Woodward, A.M. (2006). Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *The Journal of Cell Biology* **173**, 673-683.
- Woolven, B.P., Frenken, L.G., van der Logt, P. and Nicholls, P.J. (1999). The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics* **50**, 98-101.
- Wray, J., Liu, J., Nickoloff, J.A. and Shen, Z. (2008). Distinct RAD51 Associations with RAD52 and BCCIP in Response to DNA Damage and Replication Stress. *Cancer Research* **68**, 2699-2707.
- Xie, A., Kwok, A. and Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 814-818.
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., *et al.* (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* **449**, 478-482.
- Yaneva, M., Kowalewski, T. and Lieber, M.R. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* **16**, 5098-5112.
- Ying, S., Hamdy, F.C. and Helleday, T. (2012). Mre11-Dependent Degradation of Stalled DNA Replication Forks Is Prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Research* **72**, 2814-2821.

- You, Z. and Bailis, J.M. (2010). DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends in Cell Biology* **20**, 402-409.
- Yu, X. (2006). BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes & Development* **20**, 1721-1726.
- Yuan, J. and Chen, J. (2011). The Role of the Human SWI5-MEI5 Complex in Homologous Recombination Repair. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 9888-9893.
- Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B. and Yu, X. (2009). PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Current Biology* **19**, 524-529.
- Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L. and Nussenzweig, A. (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **11**, 105-109.
- Zhuang, J., Jiang, G., Willers, H. and Xia, F. (2009). Exonuclease function of human Mre11 promotes deletional nonhomologous end joining. *J Biol Chem* **284**, 30565-30573.
- Zickler, D. and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* **33**, 603-754.
- Zolghadr, K., Mortusewicz, O., Rothbauer, U., Kleinhans, R., Goehler, H., Wanker, E.E., et al. (2008). A fluorescent two-hybrid assay for direct visualization of protein interactions in living cells. *Mol Cell Proteomics* **7**, 2279-2287.
- Zou, L. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* **300**, 1542-1548.
- Zou, L., Cortez, D. and Elledge, S.J. (2002). Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* **16**, 198-208.
- Zou, L. and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-1548.
- Zou, L. and Stillman, B. (1998). Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* **280**, 593-596.

Nouveau biomarqueur de cassures double-brin de l'ADN et génotoxicité de la *Cytolethal Distending Toxin*

L'ADN est constamment la cible de dommages, issus de sources endogènes et exogènes. Parmi ces dommages, les cassures double-brin de l'ADN (CDB) représentent des lésions très cytotoxiques. La cellule peut détecter et réparer ces CDB, mais une réparation infidèle crée des mutations, sources de cancers. Ainsi, élucider les causes et les mécanismes responsables des CDB et suivre leur gestion par la cellule sont des éléments importants pour la compréhension de la génotoxicité. Les techniques actuelles de détection des CDB ne permettent d'analyser l'état de l'ADN qu'à un instant fixe. Le but de la première partie de ma thèse a donc été de créer un outil pour suivre la formation de CDB en temps réel, sur cellules vivantes. Nous avons sélectionné puis fait exprimer un nanobody (fragment d'anticorps monochaine de *camélidés*) intracellulaire dirigé contre un marqueur de CDB (γ H2AX), qui semble se relocaliser aux CDB. La seconde partie de ma thèse a permis d'éclaircir le mécanisme d'action d'une génotoxine bactérienne : la *Cytolethal Distending Toxin* (CDT). La toxine CDT, sécrétée par des bactéries commensales et pathogènes, crée des CDB dans les cellules. Si CDT est décrite comme créant des CDB directes, j'ai pu montrer qu'à la Dose Létale 50, CDT produit d'abord des cassures simple-brin qui dérivent en CDB au cours de la réplication et qui sont réparées par recombinaison homologue. En conclusion, mon travail de thèse a permis d'une part de développer un outil innovant permettant d'analyser la dynamique en temps réel des CDB en cellules humaine et, d'autre part, d'éclaircir le mécanisme de la génotoxicité de CDT, toxine représentant un risque cancérigène chez les mammifères.

Real-time biomarker of DNA double-strand breaks and *Cytolethal Distending Toxin* genotoxicity

DNA is constantly damaged, by endogenous or exogenous sources. Among these damages, DNA double-strand breaks (DSB) are one of the most cytotoxic lesions. Cells can detect and repair these DSB, but an inaccurate repair can lead to mutations and cancers. So, elucidating causes and mechanisms of DSB and following DSB management by the cell are important elements to understand genotoxicity. Current techniques to detect DSB only give informations on the DNA degradation state for a given timepoint. The goal of the first part of my thesis was to create an innovating tool to follow DSB formation real-time, in living cells. We selected an intracellular nanobody (fragment of a monochain camelids antibody) directed against a DSB marker (γ H2AX), which seems to relocate to DSB sites. The second part of my thesis work allowed us to elucidate the mechanism of action of a bacterial genotoxin: the *Cytolethal Distending Toxin* (CDT). CDT is secreted by pathogenous and commensal bacteria and induces DSB in exposed cells. If CDT was previously known to induce direct DSB, I show that for lethal dose 50, CDT induces first single-strand breaks that are converted into DSB through DNA replication. These DSB are repaired by homologous recombination. In conclusion, thanks to my thesis work, I developed an innovative tool to analyze DSB dynamics in real time in human cells, in a first hand. In a second hand, we elucidated CDT mechanism of action, a toxin representing a cancerogenous risk for mammals.